



SKRIPSI - TK141581

**Optimasi Fermentasi Produksi Etanol dari Nira Siwalan
(*Borassus flabellifer*) Menggunakan Mikroorganisme
Saccharomyces cerevisiae dan *Pichia stipitis* dengan
*Response Surface Methodology***

Disusun Oleh:

Belli Martha Judika Silaban

NRP. 2313100046

Li Felix Yuwono

NRP. 2313100075

Dosen Pembimbing:

Prof. Dr. Ir.Tri Widjaja, M. Eng

NIP. 1961 1021 1986 03 1001

**LABORATORIUM TEKNOLOGI BIOKIMIA
DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA
FAKULTAS TEKNOLOGI INDUSTRI
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2017**



FINAL PROJECT - TK141581

**Optimization of Fermentation of Ethanol Produced from
Palmyra Sap (*Borassus flabellifer*) Using *Saccharomyces
cerevisiae* and *Pichia stipitis* with Response Surface
Methodology**

By:

Belli Martha Judika Silaban

NRP. 2313100046

Li Felix Yuwono

NRP. 2313100075

Advisor:

Prof. Dr. Ir.Tri Widjaja, M. Eng

NIP. 1961 1021 1986 03 1001

**BIOCHEMISTRY TECHNOLOGY LABORATORY
DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING
FACULTY OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY
SEPULUH NOPEMBER INSTITUTE OF TECHNOLOGY
SURABAYA
2017**

LEMBAR PENGESAHAN

**“Optimasi Fermentasi Produksi Etanol dari Nira Siwalan
(*Borassus flabellifer*) Menggunakan Mikroorganisme
Saccharomyces cerevisiae dan *Pichia stipitis* dengan Response
Surface Methodology”**

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Sarjana Teknik pada Program Studi S-1 Departemen Teknik
Kimia Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya


Oleh :

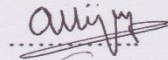
**Belli Martha Judika Silaban
Li Felix Yuwono**

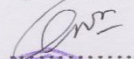
**NRP. 2313 100 046
NRP. 2313 100 075**

Disetujui oleh Tim Penguji Tugas Akhir :

1. Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng
(Pembimbing)
2. Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng
(Penguji I)
3. Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D
(Penguji II)
4. Hakun Wirawasista A., S.T., M.MT., Ph.D
(Penguji III)


.....


.....


.....


.....



Optimasi Fermentasi Produksi Etanol dari Nira Siwalan (*Borassus flabellifer*) Menggunakan Mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* dengan Metode Respon Permukaan (*Response Surface Methodology*)

Mahasiswa : 1. Belli Martha J. Silaban (2313100046)
2. Li, Felix Yuwono (2313100075)
Pembimbing : Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng

ABSTRAK

Pertumbuhan populasi manusia yang pesat menyebabkan konsumsi energi naik secara signifikan. Sehingga eksploitasi terhadap sumber daya fosil yang jumlahnya terbatas pun terus dilakukan. Bioetanol sebagai hasil dari fermentasi gula, pati, atau bahan berselulosa diharapkan dapat menggantikan minyak bumi sebagai bahan bakar, karena bahan bakunya yang dapat diperbaharui dan ramah lingkungan. Nira Siwalan yang komponen gula utamanya terdiri dari sukrosa, glukosa, dan fruktosa dapat digunakan sebagai bahan baku etanol sekaligus meningkatkan nilai guna dan harga jualnya. Kandungan gula yang mencapai 10-20% sangat baik jika digunakan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. *Saccharomyces cerevisiae* adalah mikroorganisme yang biasa digunakan untuk fermentasi bioetanol, karena mempunyai toleransi yang tinggi terhadap alkohol, laju fermentasi yang cepat, dan menghasilkan yield etanol yang tinggi. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa *Pichia stipitis* dapat digunakan sebagai mikroorganisme alternatif untuk fermentasi, karena kemampuannya mengurai gula dalam konsentrasi tinggi, waktu fermentasi cepat, dan menghasilkan produksi etanol optimal dalam kondisi mikroaerobik. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan dan membandingkan parameter fisik yang dibutuhkan untuk fermentasi nira siwalan dengan *Saccharomyces cerevisiae* dan kultur campuran antara *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia*

stipitis untuk menghasilkan konsentrasi etanol optimum. Fermentasi dilakukan secara batch sampai 80 jam dengan volume kerja 100 mL, mikroorganisme tersebut dikultivasi dalam nira steril dan parameter fisik yang diterapkan adalah pH, konsentrasi inokulum, dan konsentrasi gula. Eksperimen dilakukan sebanyak 19 kali didasarkan pada *Central Composite Design* (CCD). *Response Surface Methodology* (RSM) digunakan untuk mengetahui kondisi optimum untuk menghasilkan yield etanol tertinggi dengan variasi parameter fisik yang ditetapkan. Yield etanol tertinggi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* adalah 0.2368 (g/g) diperoleh pada pH 4.8, konsentrasi inokulum $12,740,970 \text{ sel.mL}^{-1}/\text{gL}^{-1}$ glukosa, dan konsentrasi gula 110 g/L. Sementara kultur campuran antara *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* menghasilkan yield etanol maksimum 0.4269 (g/g) pada pH 5, konsentrasi inokulum $7,251,454 \text{ sel.mL}^{-1}/\text{gL}^{-1}$ glukosa, dan konsentrasi gula 110 g/L. Model menunjukkan bahwa parameter pH dan konsentrasi inokulum paling berpengaruh signifikan terhadap yield etanol yang dihasilkan untuk kedua variabel mikroorganisme. Dibutuhkan range yang lebih besar agar konsentrasi gula juga memiliki pengaruh yang signifikan, tetapi karena keterbatasan bahan baku, maka hanya bisa menggunakan range 110 – 130 g/L. Dari sini kita dapat menyimpulkan bahwa kultur campuran antara *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* memberikan hasil yang lebih baik pada produksi etanol dan waktu fermentasi yang lebih cepat yaitu 48 jam daripada kultur murni *Saccharomyces cerevisiae* yang membutuhkan waktu 80 jam untuk proses fermentasi. Eksperimen juga telah dilakukan untuk membuktikan hasil teoritis optimasi oleh RSM. Hasil eksperimen menunjukkan fermentasi optimum *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan yield 0.2221 (g/g) dan deviasi 6.2% sedangkan *mixed culture* menghasilkan yield 0.4066 (g/g) dan deviasi 4.8%.

Kata Kunci: Etanol; Nira Siwalan; Fermentasi *Batch*; *Saccharomyces cerevisiae*; *Pichia stipitis*; CCD; RSM

Optimization of Fermentation of Ethanol Produced from Palmyra Sap (*Borassus flabellifer*) Using *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* with Response Surface Methodology

Student : 1. Belli Martha J. Silaban (231310046)
2. Li, Felix Yuwono (2313100075)
Advisor : Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng

ABSTRACT

The rapid growth of human population caused the energy consumption raised significantly. Because of that, the exploitation of the limited resources of fossils continues. Much research on alternative energy sources is continued to overcome the scarcity of energy, one of which is bioethanol. Bioethanol as the result of sugar fermentation is expected to replace petroleum as fuel, because its raw material can be renewed and environmentally friendly. The raw materials can be sugar based, starch based, or cellulosic based. Palmyra sap (*Borassus flabellifer*) whose main sugar components consist of sucrose, glucose, and fructose can be used as ethanol feedstock while increasing the economic value. Palmyra trees can grow in tropical area especially in the coastal area. The high sugar contain which reaches 10-20% is good for using as bioethanol raw material. *Saccharomyces cerevisiae* is conventional microorganism for ethanol fermentation, because of the high alcohol tolerance, rapid fermentation rate, and produces high ethanol yields. Recent studies have shown that *Pichia stipitis* can be used as an alternative microorganism for ethanol fermentation, because of its ability to break down sugars in high concentration, rapid fermentation times, and produce optimal ethanol concentration in microaerobic conditions. This study aims to determine and compare the physical parameters required for the

fermentation of Palmyra sap using *Saccharomyces cerevisiae* and mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* to produce optimum ethanol concentration. Fermentation was carried out batch wise with a working volume of 100 mL and up to 80 hours fermentation time. The microorganisms were cultivated in sterile sap and the physical parameters varied were pH, inoculum concentration, and sugar concentration. The experiment was conducted in 19 runs based on design by Central Composite Design (CCD). Response surface methodology is used to determine the optimum conditions to produce the highest ethanol yield with variation of established physical parameters. The highest ethanol yield using *Saccharomyces cerevisiae* was 0.2368 (g/g) obtained at pH 4.77, inoculum concentration $12,740,970 \text{ cell.mL}^{-1}/\text{gL}^{-1}$ glucose, and sugar concentration 110 g/L. While mixed culture between *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* resulted in maximum ethanol yield of 0.4269 (g/g) at pH 4.95, inoculum concentration $7,251,454 \text{ cell.mL}^{-1}/\text{gL}^{-1}$ glucose, and sugar concentration 110 g/L. The model showed that pH and inoculum concentration parameters had the most significant effect on the yield of ethanol produced by the two microorganism variables because their p values were less than 0.05. It takes a larger range so that sugar concentration also have a significant effect, but because of the limitation of the feedstock the sugar concentration range remain small. From these result we can conclude that mixed culture between *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* gives better results on ethanol production and faster fermentation time which 48 hours than pure culture of *Saccharomyces cerevisiae* that takes fermentation time up to 80 hours. The experiment of optimum condition has been done to verified the optimization theoretical result by response surface and the result shown that the yield are 0.2221 (g/g) for *Saccharomyces cerevisiae* and 0.4066 (g/g) for mixed culture. The deviation for *Saccharomyces cerevisiae* was 6.2% and for mixed culture was 4.8 %.

Keywords: Ethanol; Palmyra sap; Batch fermentation; *Saccharomyces cerevisiae*; *Pichia stipitis*; CCD; RSM

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, yang selalu melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga kami dapat menyelesaikan Proposal Skripsi yang berjudul:

"Optimasi Fermentasi Produksi Etanol dari Nira Siwalan (*Borassus flabellifer*) dengan Menggunakan Mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* dengan Response Surface Methodology"

tepat pada waktunya. Proposal skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi program Strata-1 di Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.

Penulis menyadari dalam penyusunan Proposal Skripsi ini tidak akan selesai tanpa bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini kami ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan kesempatan, kepintaran, kekuatan, kesehatan, kasih sayang, petunjuk, dan waktu yang cukup dalam penyelesaian Tugas Akhir ini
2. Orang tua serta saudara-saudara kami, atas doa, bimbingan, perhatian, serta kasih sayang yang selalu tercurah selama ini.
3. Bapak Juwari S.T. Ph.D. selaku Ketua Departemen Teknik Kimia, FTI-ITS.
4. Bapak Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng selaku Dosen Pembimbing Laboratorium Teknologi Biokimia, Departemen Teknik Kimia FTI-ITS, atas bimbingan, saran, dan motivasi yang diberikan.
5. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng selaku Kepala Laboratorium Teknologi Biokimia, Departemen Teknik Kimia FTI-ITS.
6. Bapak dan Ibu Dosen pengajar dan seluruh karyawan Departemen Teknik Kimia FTI-ITS atas ilmu dan bantuan yang diberikan.

7. Sahabat-sahabat terbaik penulis dan ABISS 2013 atas dukungan, semangat, dan kebersamaan selama mengerjakan Tugas Akhir.
8. Teman-teman Angkatan 2013 dan teman-teman di Laboratorium Biokimia Departemen Teknik Kimia FTI-ITS yang telah memberikan bantuan dalam pembuatan proposal ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih banyak terdapat kekurangan, sehingga saran dan kritik yang membangun dari pembaca sangat diperlukan. Akhir kata semoga skripsi ini dapat bermanfaat untuk pembaca.

Surabaya, Juli 2017

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGESAHAN	
ABSTRAK	
ABSTRACT	
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR TABEL	vi
BAB I PENDAHULUAN	
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Batasan Penelitian	4
I.4 Tujuan Penelitian	4
I.5 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
II.1 Teori Penunjang	6
II.1.1 Energi Terbarukan dan Bioetanol	7
II.1.2 Nira Siwalan	8
II.1.3 Proses Fermentasi	10
II.1.4 Mikroorganisme untuk Fermentasi	13
II.1.5 Optimasi Fermentasi	14
II.2 Studi Hasil Penelitian Sebelumnya	17
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
III.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	21
III.2 Alat dan Bahan Penelitian	21
III.2.1 Bahan Penelitian	21
III.2.2 Alat Penelitian	21
III.3 Tahapan Penelitian	22
III.3.1 Tahap Persiapan	22
III.3.2 Tahap Fermentasi	22
III.3.3 Tahap Optimasi	26
III.4 Bahan dan Metode Pelaksanaan Kegiatan	27
III.4.1 Metodologi Fermentasi	27

III.4.2 Analisa Hasil Fermentasi	29
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
IV.1 Fermentasi oleh <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
IV.1.1 Pertumbuhan Sel	34
IV.1.2 Analisa Gula Reduksi	37
IV.1.3 Optimasi	39
IV.2 Fermentasi oleh <i>Mixed Culture</i>	47
IV.2.1 Pertumbuhan Sel	47
IV.2.2 Analisa Gula Reduksi	50
IV.2.3 Optimasi	52
IV.3 Perbandingan Efek Mikroorganisme Terhadap Kondisi Optimum Produksi Etanol	59
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	61
V.1 Kesimpulan	61
V.2 Saran	61
DAFTAR PUSTAKA	vii
APPENDIKS	A

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tanaman Siwalan	9
Gambar 2.2	<i>Central Composite Design</i> untuk $k=2$ dan $k=3$	16
Gambar 3.1	Diagram Alir Penelitian.....	22
Gambar 3.2	Haemocytometer Neubauer	29
Gambar 3.3	Analisa Kadar Gula Reduksi dengan Metode DNS.....	31
Gambar 4.1	Kurva Pertumbuhan <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	35
Gambar 4.2	Kurva Pertumbuhan <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Selama Proses Fermentasi.....	36
Gambar 4.3	Kadar Gula Reduksi pada Proses Fermentasi Menggunakan Mikroorganisme <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
Gambar 4.4	Hasil Konsentrasi Etanol dari Penelitian Lin, dkk (2011)	42
Gambar 4.5	Grafik <i>Response Surface</i> Optimasi Yield Etanol untuk <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
Gambar 4.6	Kontur Plot Optimasi Yield Etanol untuk Mikroorganisme <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
Gambar 4.7	Kurva Pertumbuhan <i>Mixed Culture</i>	48
Gambar 4.8	Kurva Pertumbuhan <i>Mixed Culture</i> Selama Proses Fermentasi	50
Gambar 4.9	Kadar Gula Reduksi pada Proses Fermentasi <i>Mixed Culture</i>	51
Gambar 4.10	Grafik <i>Response Surface</i> Optimasi Yield Etanol untuk <i>Mixed Culture</i>	56
Gambar 4.11	Kontur Plot Optimasi Yield Etanol untuk <i>Mixed Culture</i>	58

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Standar Nasional Kualitas Bioetanol	7
Tabel 3.1	Variabel yang Digunakan dalam Proses Fermentasi	23
Tabel 3.2	Matriks CCD untuk 3 Variabel Independen	24
Tabel 4.1	Kandungan Gula dalam Nira Siwalan	33
Tabel 4.2	Variabel Eksperimen pada Fermentasi Menggunakan Mikroorganisme <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
Tabel 4.3	Matriks CCD untuk Eksperimen <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
Tabel 4.4	Signifikansi Statistik dari Koefisien Regresi Produksi Etanol dengan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
Tabel 4.5	Yield Etanol Eksperimen dan Prediktif <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
Tabel 4.6	Variabel Eksperimen pada Fermentasi Menggunakan <i>Mixed Culture</i>	52
Tabel 4.7	Matriks CCD untuk Eksperimen <i>Mixed Culture</i>	52
Tabel 4.8	Signifikansi Statistik dari Koefisien Regresi Produksi Etanol dengan <i>Mixed Culture</i>	54
Tabel 4.9	Yield Etanol Eksperimen dan Prediktif untuk <i>Mixed Culture</i>	55
Tabel 4.10	Perbandingan Kondisi Optimum	59

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Energi merupakan salah satu komponen vital bagi manusia untuk melangsungkan kegiatan sehari-hari. Meningkatnya populasi penduduk menyebabkan konsumsi energi semakin meningkat sehingga eksploitasi terhadap sumber energi fosil seperti batubara, minyak bumi, dan gas alam semakin meningkat pula (Herawati dan Wibawa, 2010). Padahal sumber energi fosil jumlahnya sangat terbatas di alam dan tidak dapat diperbaharui sehingga suatu saat akan habis. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan sumber energi terbarukan yang dapat diperbaharui dan ramah lingkungan sebagai alternatif energi menggantikan sumber energi fosil (Silva, dkk., 2016).

Sumber energi dari biomassa, seperti bioetanol adalah salah satu alternatif yang menjanjikan dan ramah lingkungan karena kadar emisi karbonnya yang rendah (Karagoz, dkk., 2012). Etanol dapat diproduksi dari beberapa bahan baku, yaitu bahan bergula, berpati, dan berlignoseulosa. Pemilihan bahan dasar sangat penting untuk mengurangi biaya produksi dan meningkatkan efisiensi produksi etanol (Elisson, dkk., 2001).

Salah satu bahan bergula yang dapat dimanfaatkan menjadi bahan baku pembuatan bioetanol adalah nira siwalan (*Borassus flabellifer*) yang diperoleh dari pohon palem siwalan. Pohon palem siwalan ini banyak terdapat di pesisir pantai Jawa Timur. Nira siwalan mengandung 10,96% gula (Bila, dkk., 2011) dan biasanya difermentasi untuk dijadikan minuman beralkohol tradisional, seperti tuak dan cuka.

Pohon siwalan dapat menghasilkan 6-10 liter nira per hari. Satu pohon siwalan dapat menghasilkan 100 liter nira dan 14.800 liter nira dapat diperoleh dari satu hektar tanaman (Udom, 1987). Dari segi kualitas dan kuantitas tersebut, maka siwalan memiliki potensi yang cukup tinggi untuk dikembangkan sebagai bahan

baku pembuatan etanol biofuel dikarenakan permintaan bahan bakar etanol yang meningkat (Veluraja K., 2012).

Bioetanol (C_2H_5OH) diperoleh melalui proses fermentasi gula sederhana/glukosa yang terdapat pada bahan alami (tumbuh-tumbuhan) dengan memanfaatkan kemampuan mikroorganisme tertentu. Telah dilakukan beberapa penelitian tentang kemampuan fermentasi mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*.

Fermentasi pada umumnya menggunakan proses *batch*. Pada dasarnya, fermentasi *batch* adalah sistem tertutup, tidak ada penambahan media baru, tidak ada penambahan (O_2), *antifoam*, asam/basa dilakukan dengan cara kontrol pH. Fermentasi *batch* banyak digunakan di dunia industri untuk memproduksi etanol karena kemudahan dalam proses sterilisasi dan pengontrolan alat (Widjaja, dkk., 2010). Tetapi ada beberapa kekurangan dari fermentasi *batch* yaitu, hambatan karena tingginya kadar gula, konsentrasi *yield* etanol yang terbatas (12%) dan produktivitas yang rendah (Widjaja, dkk., 2016). Meskipun demikian fermentasi *batch* masih menjadi pilihan dikarenakan *yield* yang diperoleh lebih tinggi dibandingkan dengan metode lain (Silviana, dkk., 2010).

Fermentasi bioetanol dari nira siwalan dapat dilakukan dengan bantuan ragi anggur (*Saccharomyces cerevisiae*). Pada penelitian terdahulu, optimasi proses fermentasi menggunakan bakteri *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan kondisi optimal pada suhu $32^{\circ}C$, pH 5,5, dan waktu fermentasi 48 jam (Nutrition A., 2012). Penelitian lain menyebutkan kondisi optimal untuk fermentasi nira siwalan menjadi etanol biofuel yaitu pH 5,57 dan konsentrasi inokulum 3.976.760 sel/ml.

Mikroorganisme lain yang dapat digunakan untuk fermentasi nira siwalan menjadi bioetanol adalah *Pichia stipitis*. Pada penelitian yang dilakukan oleh Jenova dkk. (2013) *yield* bioetanol pada fermentasi nira nipah paling tinggi diperoleh pada waktu fermentasi 48 jam dengan volume starter 20% yaitu 92,244%. Penelitian lain yang dilakukan oleh (Widjaja, dkk.,

2014), fermentasi bioetanol dari nira sorgum dengan menggunakan campuran mikroorganisme *Pichia stipitis* dan *Saccharomyces cerevisiae* memproduksi 6,36% etanol. Sementara fermentasi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* hanya memproduksi 4,72% etanol.

Dari informasi di atas dapat diketahui bahwa, belum semua variabel yang berpengaruh dalam proses fermentasi telah diketahui nilai optimalnya. Oleh karena itu kami mengajukan proposal penelitian berjudul:

“Optimasi Fermentasi Produksi Etanol dari Nira Siwalan (*Borassus flabellifer*) Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* dengan Response Surface Methodology (RSM)”

I.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian Optimasi Fermentasi Nira Siwalan (*Borassus flabellifer*) dengan Menggunakan Mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* adalah:

1. Terdapat pengaruh konsentrasi inokulum terhadap produksi etanol menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan kombinasi antara *Saccharomyces cerevisiae* dengan *Pichia stipitis*.
2. Terdapat pengaruh pH terhadap produksi etanol menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan kombinasi antara *Saccharomyces cerevisiae* dengan *Pichia stipitis*.
3. Terdapat pengaruh konsentrasi gula terhadap produksi etanol menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan kombinasi antara *Saccharomyces cerevisiae* dengan *Pichia stipitis*.
4. Terdapat perbedaan kondisi optimal dalam produksi etanol menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae*

dan kombinasi antara *Saccharomyces cerevisiae* dengan *Pichia stipitis*.

I.3 Batasan Penelitian

Agar penelitian ini tidak menyimpang dari ketentuan yang digariskan maka diambil batasan dan asumsi:

1. Yang akan dikerjakan dalam tugas akhir ini adalah pembuatan etanol dengan bahan baku nira siwalan.
2. Mikroorganisme yang akan digunakan untuk fermentasi adalah *Saccharomyces cerevisiae* dan kombinasi antara *Saccharomyces cerevisiae* dengan *Pichia stipitis*.
3. Fermentor yang digunakan pada proses pembuatan etanol adalah fermentor *batch*.

I.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian Optimasi Fermentasi Nira Siwalan (*Borassus flabellifer*) dengan Menggunakan Mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* adalah:

1. Mengetahui pengaruh dari variasi konsentrasi inokulum terhadap produksi etanol menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan kombinasi antara *Saccharomyces cerevisiae* dengan *Pichia stipitis*.
2. Mengetahui pengaruh dari variasi pH terhadap produksi etanol menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan kombinasi antara *Saccharomyces cerevisiae* dengan *Pichia stipitis*.
3. Mengetahui pengaruh dari variasi konsentrasi gula terhadap produksi etanol menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan kombinasi antara *Saccharomyces cerevisiae* dengan *Pichia stipitis*.
4. Mengetahui kondisi optimum fermentasi nira siwalan dan perbedaannya dalam produksi etanol menggunakan

mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan kombinasi antara *Saccharomyces cerevisiae* dengan *Pichia stipitis*.

I.5 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian Optimasi Fermentasi Nira Siwalan (*Borassus flabellifer*) dengan Menggunakan Mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* adalah:

1. Mengembangkan potensi nira siwalan dengan proses fermentasi sebagai bahan baku pembuatan etanol biofuel untuk memenuhi kebutuhan etanol yang semakin meningkat dengan menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan kombinasi antara *Saccharomyces cerevisiae* dengan *Pichia stipitis*.
2. Memberikan solusi terhadap permasalahan pemenuhan kebutuhan energi terbarukan yang semakin meningkat akhir-akhir ini dengan mengkonversi nira siwalan menjadi etanol.
3. Mendapatkan kondisi optimum fermentasi nira siwalan menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan kombinasi antara *Saccharomyces cerevisiae* dengan *Pichia stipitis* terhadap yield dan produktivitas etanol yang dihasilkan pada kondisi: pH, kadar gula, dan jumlah inokulum dengan menggunakan metode *Reponse Surface Methodology* (RSM).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Teori Penunjang

II.1.1 Energi Terbarukan dan Bioetanol

Pemanasan global, penipisan cadangan minyak mentah, dan meningkatkan konsumsi energi menjadi alasan pentingnya untuk mengembangkan sumber energi hijau untuk menggantikan bahan bakar fosil (Karagoz, dkk., 2012). Tingginya harga minyak dan emisi gas CO₂ juga menjadi alasan pentingnya mencari sumber energi alternatif yang dapat diperbaharui.

Etanol merupakan salah satu alternatif terbaik yang dapat menggantikan bensin karena sumbernya berasal dari bahan alami dan ramah lingkungan (Humaidah, dkk., 2017). Etanol dapat diproduksi dari beberapa bahan baku yang berbeda, seperti bahan bergula, bahan berpati, dan bahan berlignoselulosa (Chrisnasari, dkk., 2011). Berdasarkan kadar alkoholnya, etanol terbagi menjadi tiga grade sebagai berikut:

- a. Grade industri dengan kadar alkohol 90 - 94%.
- b. Netral dengan kadar alkohol 96 – 99.5%, umumnya digunakan untuk minuman keras atau bahan baku fermentasi.
- c. Grade bahan bakar dengan kadar alkohol di atas 99.5%

Table 2.1 Standar Nasional Kualitas Bioetanol

Parameter	Unit, Min/Max	Spesifikasi
Kadar etanol	%-v,min	99.5 (sebelum denaturasi) 94.0 (setelah denaturasi)
Kadar methanol	mg/L,max	300
Kadar air	%-v,max	1
	%-v,min	2
Kadar denaturan	%-v,max	5
Kadar Cu	Mg/kg, max	0.1
Keasamaan sebagai CH ₃ COOH	mg/L,max	30
Tampakan ion klorida	mg/L,max	Jernih & tidak ada endapan 40
Kandungan sulfur	mg/L,max	50
Getah (gum) dicuci	mg/100 ml,max	5
pH		6.5 – 9.0

Dalam penggunaannya sebagai bahan bakar etanol dapat digunakan dalam keadaan murni (100% etanol) atau dicampur dengan bensin (Agbogbo, dkk., 2008). “Gasohol” adalah campuran bensin (gasoline) dengan etanol (alkohol) dengan kadar sebesar 10-20%. Etanol tersebut dapat dihasilkan melalui fermentasi bahan-bahan alami, sehingga etanol menjadi jawaban bagi negara-negara yang tidak memiliki industri minyak sendiri untuk mengurangi impor. Etanol memiliki nilai kalor sebesar 75,700 Btu/gallon, sedangkan bila dicampur dengan bensin, perbandingan etanol 10% maka akan menghasilkan nilai kalor sebesar 112,000 Btu/gallon.

II.1.2 Nira Siwalan

Tanaman siwalan (*Borassus flabellifer* L.) merupakan jenis tanaman palem-paleman yang memiliki sifat multiguna. Di Kabupaten Tuban area tanam siwalan mencapai 1,183 hektar (BPS Tuban 2012). Nira siwalan merupakan salah satu produk hasil pohon siwalan yang paling banyak dimanfaatkan. Nira siwalan memiliki kandungan gula yang relative tinggi yaitu sekitar 10-15 g/100 mL (Gusti N.A., dkk., 2016). Apabila dibudidayakan dengan baik, produktifitas pohon siwalan bisa mencapai 20 ton gula per hektar per tahun (Dalibard, 1997). Di dalam nira siwalan terdapat nutrisi kompleks yang terdiri dari gula, protein, nitrogen, mineral, vitamin B kompleks yang berguna bagi pertumbuhan mikroorganisme (Morton, 1998). Biasanya nira siwalan digunakan sebagai bahan baku untuk pembuatan minuman beralkohol tradisional masyarakat yang biasanya dikenal dengan nama *jaggery*, tuak, dan cuka (Ristriani, dkk., 2001).

Siwalan yang umumnya tumbuh di daerah pesisir, sejatinya dapat tumbuh di daerah dataran rendah maupun dataran tinggi sehingga pembudidayaan siwalan dapat dilakukan sejalan dengan pemanfaatan lahan kosong di Indonesia. Hal tersebut menunjukkan kemampuan adaptasi tanaman siwalan yang sangat baik (Haisy, 2011).

Nira siwalan segar tidak tahan disimpan dalam waktu yang lama, hanya beberapa jam (\pm 24-36 jam) sejak disadap akan

mengalami perubahan yang ditandai dengan timbulnya gelembung dan rasanya asam. Agar tidak terkontaminasi dan menghambat proses fermentasi dapat dilakukan dengan penambahan zat aditif, akan tetapi berbahaya bagi tubuh apabila dikonsumsi dalam jangka panjang. Selain itu, untuk memperpanjang umur penyimpanan dapat menggunakan metode pasteurisasi, tetapi metode ini dapat mempengaruhi kandungan kimia pada bahan pangan.



Gambar 2.1 Tanaman Siwalan

Adapun klarifikasi dari tanaman siwalan (*Borassus flabellifer*) adalah sebagai berikut (Agus, 2015):

Kingdom	: Plantae
Division	: Angiospermae
Class	: Monocotyledoneae
Ordo	: Palmae
Family	: Palmaceae
Genus	: Borassus
Species	: <i>Borassus flabellifer</i> Linn

Nira siwalan mengandung lebih banyak nutrisi daripada gula tebu mentah, terdiri dari 1,04% protein, 0,19% lemak, 76,86% sukrosa, 1,66% glukosa, 3,15% mineral total, 0,861% kalsium,

0,052% fosfor, 11,01 mg besi per 100 g nira, dan 0.767 mg tembaga per 100 g nira (Barh, dkk., 2008).

II.1.3 Proses Fermentasi

Fermentasi adalah proses metabolisme yang menghasilkan energi dari gula dan molekul organik lain serta tidak memerlukan oksigen atau sistem transfer elektron. Setelah glukosa diubah menjadi asam piruvat melalui proses glikolisis, pada beberapa makhluk hidup seperti bakteri, asam piruvat dapat diubah menjadi produk fermentasi. Proses glikolisis menghasilkan ATP dalam jumlah kecil, namun jumlah tersebut cukup bagi suplai energi mikroorganisme.

Proses fermentasi merupakan suatu proses kimia pada substrat organik, baik karbohidrat, protein, lemak, dan sebagainya, melalui kegiatan biokatalis dan dikenal sebagai enzim yang dihasilkan oleh jenis mikroorganisme spesifik (Prescott dan Dunn, 1981). Dalam proses mikrobiologi, fermentasi dilakukan oleh mikroba yang menghasilkan atau mempunyai enzim yang sesuai proses tersebut. Berdasarkan produk yang dihasilkan, fermentasi digolongkan menjadi dua macam, yaitu sebagai berikut:

1. Fermentasi alkoholis, yaitu fermentasi yang menghasilkan etanol sebagai produk akhir disamping produk lainnya. Misalnya pada pembuatan *wine*, *cider*, dan tape. Dalam fermentasi alkohol, mikroba yang dipakai adalah: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces anamensis*, dan *Schizosaccharomyces pourlee*.
2. Fermentasi non-alkoholis, yaitu fermentasi yang tidak menghasilkan alkohol sebagai produk akhir. Misalnya pada pembuatan temped an antibiotik.

(Agus, 2015)

Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi proses fermentasi adalah:

1. Kadar Gula

Bahan konsentrasi gula tinggi mempunyai efek negatif pada *yeast*, baik pada pertumbuhan maupun aktifitas fermentasinya.

Kadar glukosa yang baik berkisar 10-18%. Apabila terlalu pekat, aktivitas enzim akan terhambat sehingga waktu fermentasi menjadi lambat, disamping itu akan terdapat sisa gula yang tidak terpakai dan jika terlalu encer maka hasilnya berkadar alkohol rendah.

2. Nilai Keasaman

Saccharomyces cerevisiae dapat tumbuh dengan baik pada range pH 3-6, apabila pH lebih kecil dari 3 maka proses fermentasi akan berkurang kecepatannya. pH yang paling optimum untuk proses fermentasi adalah pada range 4.3-4.7. Pada pH yang lebih tinggi, adaptasi *yeast* lebih rendah dan aktivitas fermentasinya juga meningkat, tetapi terdapat juga pengaruh lain pada pembentukan produk samping, sebagai contoh jika pH tinggi maka akan meningkatkan konsentrasi gliserin. Secara mikrobiologi kondisi asam inilah yang menyebabkan terjadinya selektivitas populasi mikroba pada sari buah, didukung dengan proses sulfitasi yang ditunjukkan untuk mengurangi populasi bakteri asam asetat dan asam laktat serta berbagai *yeast* yang tidak dikehendaki sebelum proses fermentasi, sehingga proses fermentasi dapat berlangsung dengan baik.

3. Temperatur

Suhu berpengaruh terhadap proses fermentasi melalui dua hal secara langsung, yaitu mempengaruhi aktivitas enzim *yeast* dan secara langsung mempengaruhi kadar hasil alkohol karena adanya penguapan. Seperti proses biologis (enzimatik) yang lain, kecepatan fermentasi akan bertambah sesuai dengan suhu yang optimum pada umumnya 27-32°C. pada suhu 27°C etanol yang menguap sebesar 0.83% dan pada suhu 32°C sebesar 1.66%. *Saccharomyces cerevisiae* mempunyai temperatur maksimal sekitar 40-50°C dengan temperatur minimum 0°C. Pada interval 15-30°C fermentasi mengikuti pola, bahwa semakin tinggi suhu maka proses fermentasi semakin cepat berlangsung.

4. Nutrient

Nutrient diperlukan sebagai tambahan makanan bagi pertumbuhan *yeast*. Beberapa unsur yang penting untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan *yeast* adalah karbon, hidrogen, oksigen, fosfor, potasium, zat besi, dan magnesium. Unsur karbon terutama diperoleh dari gula, unsur nitrogen diperoleh dari ammonia, garam ammonium, peptida, nitrat, urea, dan senyawa-senyawa lain bergantung jenis *yeast*-nya (Prescott dan Dunn, 1981).

5. Aerasi

Oksigen diperlukan untuk pertumbuhan *yeast*, tetapi tidak diperlukan dalam proses pembentukan alkohol karena proses fermentasi bersifat anaerob.

6. Waktu

Waktu fermentasi pada umumnya sekitar 7 hari tergantung kadar gula, suhu, dan lain-lain.

Proses fermentasi etanol pada umumnya menggunakan proses *batch*. fermentasi *batch* dilakukan dengan cara memasukkan media dan inokulum secara bersamaan ke dalam bioreaktor dan pengambilan produk dilakukan pada akhir fermentasi. Saat proses fermentasi berlangsung akan terjadi perubahan kondisi dalam bioreaktor, nutrient akan berkurang sementara produk dan limbah akan bertambah. Pada dasarnya, fermentasi *batch* adalah sistem tertutup, tidak ada penambahan media baru, tidak ada penambahan (O_2), *antifoam*, asam/basa dilakukan dengan cara kontrol pH. Fermentasi *batch* banyak digunakan di dunia industri untuk memproduksi etanol karena kemudahan dalam proses sterilisasi dan pengontrolan alat (Widjaja, dkk., 2010). Tetapi ada beberapa kekurangan dari fermentasi *batch* yaitu, hambatan karena tingginya kadar gula, konsentrasi *yield* etanol yang terbatas (12%) dan produktivitas yang rendah (Widjaja, dkk., 2016). Meskipun demikian fermentasi *batch* masih menjadi pilihan dikarenakan *yield* yang diperoleh lebih tinggi dibandingkan dengan metode lain (Silviana, dkk., 2010).

II.1.4 Mikroorganisme untuk Fermentasi

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces adalah genus dalam kerajaan jamur yang mencakup banyak jenis ragi. *Saccharomyces* berasal dari Bahasa Latin yang berarti gula jamur. *Saccharomyces* merupakan mikroorganisme bersel satu, tidak berklorofil, dan termasuk dalam kelompok *Eumycetes*. Mikroorganisme ini paling banyak digunakan untuk produksi etanol karena mempunyai toleransi yang tinggi terhadap alkohol, laju fermentasi yang cepat, dan menghasilkan *yield* etanol yang tinggi (Kotter dan Ciriacy, 1993). Selain itu mikroorganisme ini mudah diperoleh, cepat berkembang biak, tahan terhadap suhu tinggi, mempunyai sifat stabil, dan cepat mengadakan adaptasi. *Saccharomyces* tumbuh baik pada suhu 30°C dan pH 4.8. Pertumbuhan *Saccharomyces* dipengaruhi oleh adanya penambahan nutrisi yaitu unsur C sebagai sumber karbon, unsur N yang diperoleh dari penambahan urea, ZA, ammonium, dan pepton, mineral, dan vitamin.

Pichia stipitis

Pichia stipitis merupakan jamur dari genus *Schefferomyces*, dominan berbentuk haploid heterolitik yang berhubungan dengan *Candida shehatae* dan spesies ragi *ascomycetous*. Seperti kebanyakan anggota *Saccharomycetales*, individu *Pichia stipitis* memiliki diameter 3 sampai 5 µm. *Pichia stipitis* termasuk dalam grup *yeast* yang diisolasi dari kayu yang membusuk dan dari larva serangga yang hidup di kayu (Toiviola, dkk., 1984). *Pichia stipitis* memproduksi etanol dalam kondisi tanpa kehadiran oksigen (Klinner, dkk., 2005). Jika laju aerasi tinggi maka sel yang akan bertambah banyak dan jika laju aerasi rendah maka etanol yang akan diproduksi (du Preez, 1994).

Pichia stipitis mampu memfermentasi glukosa, xylosa, manosa, galaktosa, dan selobiosa (Parekh dan Wayman, 1986). Tetapi *Pichia stipitis* lebih menyukai glukosa daripada xylosa dalam produksi etanol, dimana laju konsumsi glukosa lebih tinggi daripada xylosa dalam kondisi pertumbuhan yang sama (Agbogbo,

dkk., 2016). Hal ini dikarenakan *Pichia stipitis* menunjukkan baik afinitas rendah maupun tinggi terhadap pergerakan proton melalui membran. Afinitas rendah sistem pergerakan terjadi antara glukosa dan xylosa untuk pergerakan gula. Glukosa menghambat pergerakan xylosa dengan inhibitor non kompetitif dalam afinitas rendah (Kilian dan Uden, 1988).

Pada penelitian Agbogbo (2006) dilakukan fermentasi terhadap glukosa dan xylosa masing-masing 60 g/L dengan menggunakan mikroorganisme *Pichia stipitis*. Konsentrasi etanol yang dihasilkan dari fermentasi glukosa adalah 22.7 g/L dan 24.3 dari fermentasi xylosa. Tetapi untuk waktu fermentasi glukosa waktu yang dibutuhkan lebih cepat yaitu 96 jam, sedangkan untuk fermentasi xylosa membutuhkan waktu 120 jam. Hal ini menunjukkan *Pichia stipitis*, walaupun secara alami memfermentasi xylosa, juga baik untuk menguraikan glukosa.

Temperature optimal untuk proses fermentasi dengan *Pichia stipitis* adalah 25-33°C dan pH optimal adalah 4.5-5.5 (du Preez, dkk., 1986). Penambahan nutrien seperti nitrogen, vitamin, asam amino, garam amonium, dan magnesium dapat meningkatkan pertumbuhan sel dan produksi etanol. Beberapa studi menunjukkan bahwa *Pichia stipitis* memproduksi etanol tanpa kehadiran oksigen (Delgenes, dkk., 1986) tetapi keadaan mikroaerobik (sedikit oksigen) optimal untuk produksi etanol (Grootjen, dkk., 1990).

II.1.5 Optimasi Fermentasi

Optimasi merupakan suatu cara untuk menemukan nilai terbaik (maksimal maupun minimal) dari beberapa fungsi yang diberikan pada suatu konteks pada kondisi tertentu dengan memaksimalkan faktor yang diinginkan dan meminimalkan faktor yang tidak diinginkan.

Optimasi telah banyak digunakan dalam pengembangan studi produksi gula reduksi dengan hidrolisis enzimatis guna memprediksi pengaruh apa yang memiliki peranan paling besar untuk meningkatkan produksi gula reduksi. Pada penelitian oleh Kunameni dan Singh (2005), optimasi menggunakan *Response*

Surface Method ditujukan untuk memprediksi faktor-faktor yang mempengaruhi efektivitas konversi pati menjadi glukosa.

Response surface methodology (RSM) adalah sebuah teknik pemodelan empiris yang digunakan untuk mengestimasi hubungan antara variabel terikat dalam eksperimen dan hasil yang diperoleh (Lee, dkk., 2003; Li, dkk., 2002). Metode ini banyak digunakan untuk optimasi dalam bidang ilmu dan teknologi pangan karena teori yang komprehensif, efektifitas tinggi, dan sederhana (Arteaga, dkk., 1994). Sebagai contoh, ingin ditemukan nilai dari suhu (x_1) dan tekanan (x_2) yang dapat memaksimalkan *yield* pada suatu proses. *Yield* pada proses tersebut merupakan fungsi dari nilai suhu dan tekanan yang dapat dijabarkan sebagai berikut:

$$y = f(x_1, x_2) + \varepsilon$$

Dimana ε merupakan error yang diobservasi dari respon y . Jika respon yang diinginkan didenotasikan menjadi $E(y) = f(x_1, x_2) = \eta$, sehingga *surface* direpresentasikan oleh:

$$\eta = f(x_1, x_2)$$

Sebagian besar masalah dari RSM adalah bentuk hubungan antara respon dan variabel independen tidak diketahui. Sehingga langkah pertama pada metode ini adalah menemukan nilai yang cocok untuk hubungan fungsi antara y dan variabel-variabel independennya. Pada umumnya digunakan polinomial berorde rendah untuk variabel independennya. Bila respon dimodelkan dengan baik terhadap fungsi linear variabel independen, maka perkiraan fungsinya dapat menggunakan *first-order model*.

$$y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \dots + \beta_k \cdot x_k + \varepsilon$$

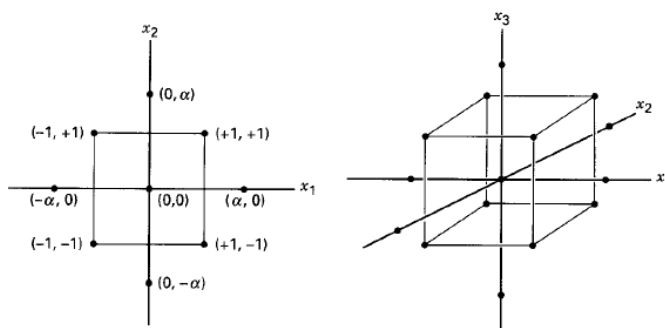
Bila terdapat pembentukan kurva pada sistem, maka penggunaan polinomial dengan derajat yang lebih tinggi harus digunakan, misalnya *second order model*.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Tujuan dari penggunaan metode ini adalah mempercepat eksperimen dan menentukan lintasan yang efisien guna

meningkatkan daerah optimum. Ketika daerah optimum telah ditemukan, model yang lebih rumit, seperti penggunaan *second order model*, dapat digunakan dan hasil analisa dapat menentukan titik optimumnya. Tujuan lain dari RSM adalah menentukan kondisi operasi optimum pada suatu sistem atau menentukan daerah operasi yang diperlukan dan diinginkan pada faktor-faktor yang mempengaruhi respon (Montgomery, 2001).

Dalam RSM, *Central Composite Design* (CCD) adalah desain eksperimen yang paling sering digunakan karena mempunyai prediksi yang sama ke semua titik dari pusat (Liu, dkk., 1998). CCD mengoptimalkan desain untuk model kuadratik dan jumlah titik eksperimen dalam CCD cukup untuk memvalidasi model yang cocok dan kekurangan dari model (Arteaga, dkk., 1994). Desain eksperimen terdiri dari F sebagai poin factorial, $2k$ sebagai poin aksial ($\pm\alpha$) dan n_c sebagai poin pusat (*center point*) (T. J. Robinson dan S. S. Wuff, 2006).



Gambar 2.2 *Central Composite Design* untuk $k=2$ dan $k=3$

Penggunaan *central composite design* sebagian besar digunakan pada percobaan sekuensial, dimana 2^k digunakan pada orde satu dan menunjukkan poin *lack of fit* serta poin aksial pada aturan kuadratik di dalam permodelan. Metode ini sangat efisien untuk pemodelan orde dua. Terdapat dua parameter yang ditetapkan pada permodelan menggunakan *central composite*

design, jarak α terhadap pusat *design* dan jumlah dari poin pusat n_c (Montgomery, 2001).

II.2 Studi Hasil Penelitian Sebelumnya

1. Ghosh S, dkk (2012) melakukan penelitian produksi *wine* dari nira siwalan dengan proses fermentasi *batch* menggunakan bakteri *Saccharomyces cerevisiae* (NCIM 3045). Dalam penelitian ini parameter fisik yang digunakan yaitu pH, suhu, dan waktu fermentasi. Optimasi menggunakan *Response surface methodology* (RSM) berdasarkan 23 faktorial *Central composite design* (CCD) yang diaplikasikan untuk mengetahui kondisi operasi optimal untuk menghasilkan *yield* etanol maksimum dari variasi pH, suhu, dan waktu fermentasi. Yield etanol tertinggi dihasilkan dari kondisi operasi dengan suhu 32°C, pH 5,5, dan waktu fermentasi 48 jam. Model optimasi menunjukkan nilai R^2 0.9973. Konsentrasi etanol tertinggi yang dihasilkan yaitu 82,3 g/liter.
2. Ratnam, B. V. V., dkk (2005) melakukan penelitian tentang optimasi produksi etanol pada variabel konsentrasi nitrogen, EDTA, temperature, pH, dan waktu fermentasi dengan Box-Wilson eksperimen *central composite design* (CCD). Ditemukan bahwa sirup gula dari nira siwalan adalah substrat yang cocok untuk proses fermentasi, dapat menghasilkan konsentrasi etanol yang tinggi dengan menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* NCIM 3090. Konsentrasi etanol maksimum sebesar 129,4 g/L didapat setelah mengoptimasi komponen dan kondisi fermentasi. Nilai optimal fermentasi didapat pada suhu 26°C, pH 8,4, dan waktu fermentasi 4,2 hari dengan 398,5 g/L substrat, 3,1 g urea, dan 0,51 g/L EDTA. Sehingga dengan CCD, dapat ditentukan nilai akurat parameter fermentasi dimana hasil maksimum produksi etanol dapat diperoleh.

3. Chrisnasari, dkk (2011) melakukan penelitian untuk mengoptimasi nira siwalan sebagai substrat untuk produksi etanol. Pengaruh kuantitatif dari konsentrasi gula, urea, dan inokulum pada produksi etanol dioptimasi menggunakan *response surface methodology* (RSM), *Box-Wilson central composite design* (CCD). Hasil penelitian menunjukkan nira siwalan dapat dimanfaatkan sebagai substrat untuk produksi etanol menggunakan *Zymomonas mobilis* (NRRL B-14234). Konsentrasi etanol maksimum yang dapat dicapai adalah 58,97 g/L dengan pengaturan kondisi fermentasi sebagai berikut: kadar gula substrat 206,01 g/L, kadar urea 3,16 g/L, dan kadar inokulum 23,05% v/v. perolehan etanol yang dihasilkan adalah 0,3039 g/g. Tingginya tingkat keasaman antara hasil prediksi model dan hasil penelitian merefleksikan akurasi dan kemampuan aplikasi RSM untuk optimasi produksi etanol.
4. Agbogbo, dkk (2006) dilakukan fermentasi terhadap glukosa dan xylosa masing-masing 60 g/L dengan menggunakan mikroorganisme *Pichia stipitis*. Konsentrasi etanol yang dihasilkan dari fermentasi glukosa adalah 22.7 g/L dan 24.3 dari fermentasi xylosa. Tetapi untuk waktu fermentasi glukosa waktu yang dibutuhkan lebih cepat yaitu 96 jam, sedangkan untuk fermentasi xylosa membutuhkan waktu 120 jam.
5. Agbogbo dan Kelly (2008) melakukan penelitian tentang produksi etanol dari bahan berselulosa menggunakan mikroorganisme pemfermentasi xylosa alami, *Pichia stipitis*. Tidak seperti serat, dimana glukosa merupakan gula utama, biomassa berselulosa mempunyai kandungan gula yang lain seperti xylosa dan arabinosa yang biasanya dikenal dengan gula C5. *Pichia stipitis* dapat memproduksi 41 g etanol/L dari biomassa berselulosa dengan potensi membersihkan sebagian besar dari kandungan bahan-bahan aditif.
6. Tri Widjaja, dkk (2015) melakukan penelitian tentang teknik produksi etanol *food-grade* dengan distilasi *batch* dan dehidrasi

menggunakan adsorben berbasis serat. Tujuan dari eksperimen ini adalah untuk mempelajari pengaruh mikroorganisme dalam proses fermentasi. Mikroorganisme yang digunakan dalam eksperimen ini adalah mutase *Zymomonas mobilis* (A3), *Saccharomyces cerevisiae*, dan campuran dengan *Pichia stipitis*. Fermentasi dilakukan dalam reaktor dan konsentrasi gula awal adalah 150 g/L. Fermentasi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan kadar etanol 4,72%, *Zymomonas mobilis* A3 memproduksi 7,78% etanol, campuran *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* memproduksi 6,36% etanol, dan campuran *Zymomonas mobilis* A3 dan *Pichia stipitis* menghasilkan 7,45% etanol.

7. Nurlaili Humaidah, dkk (2017) melakukan penelitian mengenai studi perbandingan pengaruh mikroorganisme pada optimasi pembuatan etanol dari nira siwalan (*Borassus flabellifer*) menggunakan metode RSM. Dalam penelitian ini didapatkan bahwa ada perbedaan pH optimum, dimana 5,05 untuk *Saccharomyces cerevisiae* dan 5,57 untuk *Zymomonas mobilis*. Perbedaan juga terdapat pada kandungan inokulum yaitu $3.976.760 \text{ cell.mL}^{-1}/\text{gL}^{-1}$ glukosa untuk *Saccharomyces cerevisiae* dan $2.800.000 \text{ cell.mL}^{-1}/\text{gL}^{-1}$ glukosa untuk *Zymomonas mobilis*. Kondisi optimum fermentasi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan 85,60 g/L etanol, sementara fermentasi menggunakan *Zymomonas mobilis* menghasilkan 94,75 g/L etanol. Dapat disimpulkan walaupun hasil optimasi permodelan kurang signifikan, tetapi *Zymomonas mobilis* mempunyai kinerja yang lebih baik secara keseluruhan.
8. Adivikatla, dkk (2011) melakukan penelitian tentang kultur campuran antara *Pichia stipitis* NCIM 3498 dan termotoleran *Saccharomyces cerevisiae* VS3 untuk produksi etanol menggunakan hidrolisis asam untuk mengurangi kandungan lignin batang sorgum. Kultur campuran dari kedua

mikroorganisme ini diharapkan mampu untuk memfermentasi kandungan gula dalam batang sorgum baik heksosa maupun pentosa sehingga menghasilkan konversi yang efisien dari proses hidrolisis menjadi etanol. Fermentasi menggunakan *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae* VS3 dan kultur campuran menghasilkan konsentrasi etanol berturut-turut 10.25 ± 0 ; 7.40 ± 0.07 ; dan 12 ± 0.55 g/L etanol.

9. Kocher dan Uppal (2013) melakukan penelitian tentang fermentasi glukosa dan xylosa menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* Y-2034 dan *Pachysolan tannophilus* Y-2460. Fermentasi dilakukan dalam medium campuran glukosa-xylosa (3:2) dengan konsentrasi total 50 g/L secara aerobik dan semi-aerobik. Hasil yang diperoleh adalah etanol yang diproduksi dari glukosa pada kondisi aerobik lebih signifikan daripada ketika kondisi semi-aerobik. Sementara, konsumsi gula dan pH tidak signifikan secara statistik. Hasil yang diperoleh adalah etanol yang diproduksi dari glukosa pada kondisi aerobik lebih signifikan daripada ketika kondisi semi-aerobik. Sementara, konsumsi gula dan pH tidak signifikan secara statistik. Etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi memiliki *yield* variatif antara 0.387 hingga 0.480 g/g substrat.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Biokimia, Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember – Surabaya pada bulan Februari 2017 sampai bulan Mei 2017.

III.2 Alat dan Bahan Penelitian

III.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah nira siwalan, aquadest, KH_2PO_4 (Merck), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), HCl (Merck), NaOH (Merck), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), yeast extract (Merck), Potato Dextrose Agar (Merck), Nutrient Broth (Merck), DNS (Merck), Sodium Potassium Tartrate (Sigma Aldrich), Sodium Metabisulfite (Sigma Aldrich), *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* (Laboratorium Mikrobiologi Teknik, Departemen Teknik Kimia, FTI-ITS), tisu, kapas, dan aluminium foil.

III.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *autoclave* (Astell Scientific), *hot plate* dan *magnetic stirrer* (Snidjers), *spectrophotometer* (Cecil), *analytical balance* (Ohaus), *incubator* (Inucell), *incubator shaker*, *Gas Chromatography*, mikroskop, tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer, corong kaca, pipet volumetrik, pipet tetes, *beaker glass*, labu ukur, vortex (VM-300), rak kayu, kuvet, termometer, dan sarung tangan.

III.3 Tahapan Penelitian

Berikut merupakan diagram alir penelitian ini:



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

III.3.1 Tahap Persiapan

Tahap persiapan dimulai dengan pengembangan kultur mikroorganisme, *pre-treatment* nira siwalan sebagai *feed* sesuai kebutuhan eksperimen dan persiapan pembuatan starter yang dilakukan setelah mengetahui kondisi optimum pertumbuhan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan campuran *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*.

III.3.2 Tahap Fermentasi

Proses fermentasi yang digunakan yaitu fermentasi secara *batch*. Pada prinsipnya fermentasi *batch* merupakan sistem tertutup, tidak ada penambahan media baru, ada penambahan oksigen, antifoam, dan aerasi, kondisi asam basa dilakukan dengan kontrol pH. Fermentor *batch* digunakan pada proses ini karena reaktor *batch* memiliki kemudahan dalam proses sterilisasi dan pengontrolan alat (Montgomery, 2012). Selain itu menurut penelitian yang dilakukan Hana Silviana (2010), sistem *batch* banyak diaplikasikan di industri etanol karena dapat menghasilkan kadar etanol yang tinggi.

Mikroorganisme yang digunakan pada proses fermentasi ini adalah *Saccharomyces cerevisiae* dan campuran *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* dengan variabel pH, jumlah inokulum, dan konsentrasi gula. Pada percobaan ini digunakan waktu fermentasi selama 48 jam (Ghosh, S., dkk., 2012) dan nutrisi disesuaikan dengan perbandingan C/N ratio antara 20-30. Pada setiap proses fermentasi dilakukan analisa kadar gula reduksi dan perhitungan jumlah sel mikroorganisme setiap 8 jam

sekali sampai didapatkan penurunan kadar yang konstan. Pada penelitian ini dilakukan rancangan eksperimen berdasarkan:

1. 2^k Factorial Design untuk model orde satu.
2. Rotatable Composite Second Orde Design untuk model orde dua.

Jika rancangan eksperimen orde satu tidak memenuhi, maka digunakan rancangan eksperimen orde 2 yaitu *Rotatable Composite Second Orde Design*. Dalam rancangan orde 2, rancangan eksperimen orde 1 tetap digunakan ditambah dengan *star design* dan *center replication*.

Pada kondisi operasi eksperimen terdapat 3 variabel yaitu: pH, jumlah inokulum, dan konsentrasi gula. Untuk mencari jumlah yang perlu diuji dalam eksperimen menggunakan *response surface methodology* (RSM) yaitu *central composite design* dengan $\alpha=1$ pada software Design Expert® 10. Variasi kondisi operasi yang dilakukan pada percobaan ini adalah sebagai berikut:

Tabel 3.1 Variabel yang Digunakan pada Proses Fermentasi

Faktor	Variabel	Coded Factor		
		Unit	-1	+1
A	pH	-	4,5	6,5
B	Jumlah Inokulum	jumlah sel	8075000 ¹ dan 6400000 ²	11500000 ¹ dan 7025000 ²
C	Konsentrasi Gula	gr/L	110	130

¹ *Saccharomyces cerevisiae*

² Campuran *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*

Berdasarkan table di atas, untuk menentukan jumlah eksperimen yang harus dilakukan didasarkan pada *Rotatable Composite Second Orde Design* untuk model orde dua pada variabel (k) adalah 3:

1. Factorial Design = $2^k = 2^3 = 8$
2. Star Design = $2^k = 2 \times 3 = 6$
3. Center Replication = Pengulangan di titik pusat dilakukan 5 kali

Sehingga perlu dilakukan 19 eksperimen pada variabel kondisi operasi yang diuji. Sebagai contoh variabel pH -1 adalah 4,5 dan +1 adalah 6,5 sebagai *factorial design* terdapat 8 kombinasi. Sedangkan untuk *star design* terdapat 6 kombinasi pada $(+\sqrt{k}$ atau $+\sqrt{3}$), $(-\sqrt{k}$ atau $-\sqrt{3}$), dan pada titik pusat 0 (pH = 5,5). Untuk mendefenisikan titik tersebut digunakan persamaan sebagai berikut:

$$Z = \frac{X - X_{rata - rata}}{\frac{1}{2} \Delta}$$

Persamaan di atas menjadi: $+\sqrt{3} = (X-5,5)/\left(\frac{1}{2} \times 2\right)$ sehingga $X = 7,23$ dan $-\sqrt{3} = (X-5,5)/\left(\frac{1}{2} \times 2\right)$ sehingga $X=3,77$. Dimana, $X_{rata-rata}$ = pH rata-rata dari 4,5 dan 6,5 yaitu 5,5. Delta adalah selisih antara range pH = $6,5-4,5 = 2$.

Kombinasi dapat disajikan sebagai berikut:

Tabel 3.2 Matriks CCD untuk 3 Variabel Independen

Z₁	Z₂	Z₃
-1	-1	-1
+1	-1	-1
-1	+1	-1
+1	+1	-1
-1	-1	+1
+1	-1	+1
-1	+1	+1
+1	+1	+1
$-\sqrt{3}$	0	0
$+\sqrt{3}$	0	0

0	$-\sqrt{3}$	0
0	$+\sqrt{3}$	0
0	0	$-\sqrt{3}$
0	0	$+\sqrt{3}$
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0

Pada penelitian ini dilakukan 19 kali percobaan pada proses fermentasi dengan 3 variabel yang dipilih untuk masing-masing variasi mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan campuran *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*.

Setelah diperoleh hasil fermentasi, kemudian dilakukan optimasi dengan desain eksperimen berdasarkan *Central Composite Design* (CDC) dan kurva permukaan yang digenerasi dari *software* Minitab® 16.1.1 dan hasil optimasi dihasilkan oleh *software* MATLAB®. Kemudian optimasi kadar gula dilakukan dengan metode *response surface methodology*. Respon kadar etanol diambil setelah kadar gula reduksi habis atau setelah waktu maksimal fermentasi yaitu 90 jam. Respon dianalisa dengan metode ANOVA (*Analysis of Variance*) dan analisa estimasi model dilakukan dengan *Lack of Fit Test*. *Lack of fit* adalah uji penyimpangan atau ketidaksesuaian terhadap model linear orde pertama. Apabila nilai uji *Lack of Fit* tidak signifikan, maka model regresi orde pertama dapat dikatakan sesuai.

Tahap fermentasi dimulai dengan mempersiapkan media fermentasi yang terdiri dari nira siwalan 180 ml, 1 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 gr KH_2PO_4 , 10 gr *yeast extract* dan 0,5 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Sebelum digunakan nira siwalan disterilisasi terlebih dahulu dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian ke dalam media yang telah dipersiapkan diinokulasikan mikroorganisme yang akan digunakan dan diinkubasi pada suhu 32°C hingga mencapai fase

log. Media tersebut nantinya akan digunakan sebagai starter. Fermentasi dilakukan di dalam botol berukuran 160 ml, dengan volume kerja 100 ml dimana volume starter yang digunakan adalah 10% dari volume kerja fermentor. Untuk mengatur kondisi pH, dilakukan penambahan HCl atau NaOH 1 M. Fermentasi dilakukan di dalam inkubator *shaker* pada suhu 32°C pada kondisi semi-anaerobik. Sampel diambil pada selang waktu yang telah ditentukan untuk dianalisis. Proses fermentasi dibiarkan berlangsung hingga diperoleh penurunan kadar gula yang konstan.

III.3.3 Tahap Optimasi

Optimasi dengan metode klasik menggunakan satu dimensi pencarian, melibatkan satu variabel sementara memperbaiki variabel lainnya. Metode ini hanya bisa digunakan dalam skala laboratorium dan membutuhkan waktu lama. Kekurangan dari satu faktor dalam proses optimasi dapat dihilangkan dengan mengoptimasi semua parameter yang mempengaruhi secara kolektif dengan *Central Composite Design* (CDC) dengan menggunakan Metode Respon Permukaan (*Response Surface Methodology*/RSM). Desain eksperimen, *Response Surface Methodology* (RSM) pada penelitian ini merupakan metode matematik dan statistik yang berguna untuk permodelan dan analisis dari suatu masalah dengan *response* yang dipengaruhi oleh beberapa variabel dengan tujuan untuk mengoptimasikan *response* yang diinginkan (Montgomery, 2012). Banyak variabel yang dapat mempengaruhi efisiensi dari proses fermentasi, sehingga pada penelitian ini digunakan *Central Composite Design* (CDC) untuk menentukan dampak dari variabel-variabel yang sebelumnya telah ditentukan terhadap *response* dari penelitian ini yaitu *yield* dari fermentasi bioetanol pada limbah kulit kopi.

Penentuan variabel yang sebelumnya telah dilakukan dan ditampilkan pada Tabel 3.1 kemudian diolah pada central composite design sehingga menghasilkan variabel acak sebagai

panduan dalam melakukan percobaan untuk mendapatkan *yield* fermentasi bioetanol.

Analysis of variance (ANOVA) dilakukan pada hasil perhitungan fermentasi *batch* untuk mengevaluasi setiap variabel yang digunakan untuk memiliki dampak yang signifikan pada *response* dari percobaan ini berupa *yield* fermentasi bioetanol dari nira siwalan.

III.4 Bahan dan Metode Pelaksanaan Kegiatan

III.4.1 Metodologi Fermentasi

Sebelum melakukan eksperimen pada proses fermentasi, perlu dilakukan tahap penyiapan bahan seperti berikut:

a. Pengembangan Kultur

Pichia stipitis

1. Melarutkan 19,5 gram PDA (*Potato Dextrose Agar*) dengan aquadest hingga volumenya 500 ml.
2. Menambahkan 6 gram agar batang.
3. Mendidihkan sampai suhu 70°C hingga semua bahan larut.
4. Memasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 6 ml dan menutup mulut tabung dengan aluminium foil.
5. Mensterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
6. Mendinginkan agar dalam posisi miring hingga mengeras.
7. Mengambil biakan murni dengan kawat ose steril dalam *incase*.
8. Menggoreskan kawat ose pada permukaan media agar yang baru dan menutup kembali dengan kapas.
9. Menginkubasi dalam inkubator pada suhu 32°C selama 48 jam.

Saccharomyces cerevisiae

1. Melarutkan 19,5 gram PDA (*Potato Dextrose Agar*) dengan aquadest hingga volumenya 500 ml.
2. Menambahkan 6 gram agar batang.

3. Mendidihkan sampai suhu 70°C hingga semua bahan larut.
4. Memasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 6 ml dan menutup mulut tabung dengan aluminium foil.
5. Mensterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
6. Mendinginkan agar dalam posisi miring hingga mengeras.
7. Mengambil biakan murni dengan kawat ose steril dalam *incase*.
8. Menggoreskan kawat ose pada permukaan media agar yang baru dan menutup kembali dengan kapas.
9. Menginkubasi dalam inkubator pada suhu 32°C selama 48 jam.

b. *Pre-treatment* Bahan Baku

Nira Siwalan

1. Memanaskan nira siwalan pada suhu 80°C selama 20 menit, kemudian mendinginkannya hingga suhu ruangan.
2. Melakukan sterilisasi nira siwalan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 psia selama 15 menit, kemudian mendinginkannya hingga suhu ruangan.
3. Menganalisa kadar gula nira siwalan awal sebelum dengan metode DNS.

c. Proses Fermentasi

Pembuatan Starter

1. Menyiapkan nira siwalan sebanyak 180 ml di dalam erlenmeyer.
2. Menambahkan 1 gram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 gram KH_2PO_4 , 0.5 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan 10 gram *yeast extract* sebagai media nutrisi
3. Menanamkan biakan murni *Saccharomyces cerevisiae* sebanyak 1 ose menggunakan kawat ose steril ke dalam nira yang telah ditambahkan media nutrisi di dalam *incase*.

4. Untuk variabel mikroorganisme campuran *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*, mengambil masing-masing 1 ose dan menanamkan ke dalam nira yang telah diberi media nutrisi di dalam *incase*.
5. Menutup erlenmeyer dengan kapas dan membiakkan inkubator *shaker* pada suhu 32°C hingga fase log.

Fermentasi *Batch*

1. Mempersiapkan nira siwalan 90 ml dalam botol 120 ml.
2. Menambahkan starter 10 ml (10% dari volume kerja) fermentor.
3. Menginkubasi dalam inkubator *shaker* pada suhu 32°C hingga proses fermentasi selesai.
4. Mengambil hasil fermentasi (*broth*) setiap 8 jam sekali hingga proses fermentasi selesai yang ditandai dengan kadar gula sisa yang konstan.
5. Menganalisa kadar gula sisa pada sampel (*broth*) dengan metode DNS.
6. Menganalisa kadar etanol hasil fermentasi dengan metode GC.

III.4.2 Analisa Hasil Fermentasi

a. Analisa Jumlah Sel

Menurut Caprette (2007) metode menghitung jumlah sel menggunakan sebuah alat yang disebut dengan *counting chamber* (ruang hitung). Alat ini dapat digunakan untuk menghitung jumlah sel per unit volume. Tipe *counting chamber* yang paling banyak digunakan adalah *haemocytometer*.



Gambar 3.2 *Haemacytometer* Neubauer

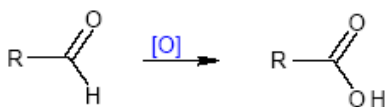
Berikut ini langkah-langkah yang dilakukan untuk analisa jumlah sel mikroorganisme:

1. Mengencerkan 1 ml sampel dengan 9 ml aquadest steril.
 2. Meneteskan ke permukaan *counting chamber* hingga dapat menutupi seluruh permukaanya dan menutup dengan *deck glass*.
 3. Kemudian *haemacytometer* diletakkan di bawah lensa mikroskop untuk dihitung jumlah selnya.
 4. Melakukan pengamatan dengan mikroskop dengan perbesaran 400x.
- b. Analisa Kadar Residu Glukosa

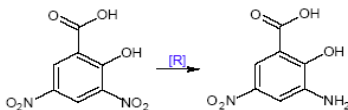
Analisa residu glukosa sebagai gula reduksi dilakukan dengan metode DNS. Dalam analisa ini terlebih dahulu dibuat kurva standar glukosa. Metode DNS adalah metode penentuan kadar gula reduksi dengan menggunakan pereaksi asam 3,5 – dinitrosalisilat. Metode ini digunakan untuk menguji keberadaan gugus karbonil bebas atau yang biasa disebut dengan gula reduksi. Gugus karbonil didapatkan dari reaksi oksidasi gugus aldehyd dalam glukosa atau gugus keton dalam fruktosa. Selain reaksi oksidasi, dalam kondisi basa juga terjadi reaksi reduksi, yaitu asam 3,5 – dinitrosalisilat (DNS)

menjadi 3 – amino, 5 – asam nitrosalisilat. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:

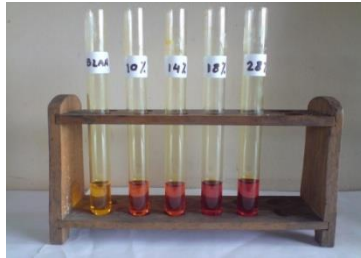
✓ Gugus aldehid $\xrightarrow{\text{oksidasi}}$ gugus karbonil



✓ Asam 3,5 – dinitrosalisilat $\xrightarrow{\text{reduksi}}$ 3 – amino, 5 – asam nitrosalisilat



Reaksi di atas menunjukkan bahwa 1 mol gula (gugus aldehid) akan bereaksi dengan 1 mol asam 3,5 – dinitrosalisilat. Reaksi oksidasi glukosa dapat dipengaruhi oleh oksigen terlarut, karena itu ditambahkan sulfit ke dalam larutan pereaksi DNS untuk menyerap oksigen terlarut tersebut. Selain itu juga ditambahkan NaOH untuk menciptakan kondisi basa.



Gambar 3.3 Analisa Kadar Gula Reduksi dengan Metode DNS

Langkah-langkah yang digunakan untuk analisa kadar residu glukosa:

1. Pembuatan Larutan DNS (Asam Dintrosalisilat) (Widjaja, dkk., 2009)
 - Menimbang 16 gram NaOH dan dilarutkan menggunakan aquadest sampai volume 200 ml.
 - Menimbang 30 gram sodium potassium tartrat dan 8 gram sodium metabisulfit. Kemudian melarutkan dengan aquadest sampai volume 500 ml.
 - Melarutkan 10 gram DNS menggunakan larutan NaOH sebanyak 200 ml.
 - Menambahkan larutan DNS kedalam larutan sodium potassium tartrat dan sodium metabisulfit.
 - Menambahkan aquadest sampai volumenya tepat 1000 ml. larutan diaduk sampai benar-benar terlarut sempurna.
2. Pembuatan Larutan Standar Glukosa
 - Menimbang sebanyak 0,367 gram glukosa dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml.
 - Menambahkan aquadest hingga volume 100 ml.

3. Pembuatan Kurva Standard Glukosa

- Mengisi masing-masing 6 tabung reaksi dengan larutan induk glukosa berturut-turut sebanyak 0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, dan 5 ml.
- Menambahkan aquadest ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml, dan 0 ml sehingga diperoleh 6 macam konsentrasi larutan standar glukosa.
- Mengambil 2 ml dari tiap konsentrasi larutan standar glukosa dan ditambahkan 3 ml aquadest ke dalam tabung reaksi.
- Menambahkan masing-masing 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) dan divortex hingga homogen.
- Memanaskan masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan pada air mendidih selama 10 menit.
- Mendinginkan dalam air es selama 10 menit.
- Merendam campuran tersebut pada air dengan suhu ruang ($\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) selama 10 menit.
- Mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Kurva kalibrasi larutan standar glukosa dibuat dengan cara mengeplot konsentrasi glukosa terhadap absorbansi.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan dengan metode fermentasi *batch*. Prinsip fermentasi *batch* adalah memasukkan media, nutrisi dan inokulum secara hampir bersamaan kedalam fermentor dan pengambilan produk dilakukan setelah proses fermentasi selesai. Pada saat proses fermentasi berlangsung akan terjadi perubahan kondisi, baik pada media maupun inokulum di dalam fermentor.

Penelitian ini bertujuan untuk mencari kondisi operasi optimum untuk proses fermentasi nira siwalan menjadi etanol dengan variabel pH, konsentrasi gula dalam g/L, konsentrasi inokulum dalam jumlah sel/mL. Optimasi dilakukan dengan desain eksperimen berdasarkan *Central Composite Design* (CCD) dan kurva permukaan yang digenerasi dari *software* Minitab® 16.1.1.

Nira siwalan diambil dari Kota Tuban, Provinsi Jawa Timur. Sebelum penelitian dilakukan, terlebih dahulu dilakukan pengukuran kadar gula dan jenis gula yang terkandung dalam nira siwalan. Metode pengukuran kadar dan jenis gula di dalam nira dilakukan dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatograph*) yang dilakukan di Unit Layanan Pengujian Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Berikut adalah hasil pengujian kandungan gula dalam nira siwalan:

Tabel 4.1 Kandungan Gula dalam Nira Siwalan

Jenis Gula	Kadar
Fruktosa	199 gr/L
Glukosa	154 gr/L
Sukrosa	105 gr/L

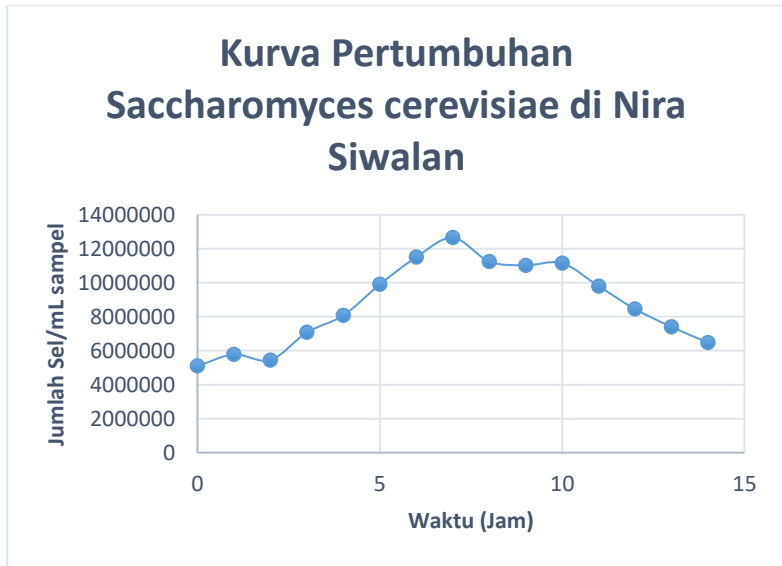
Selama proses fermentasi dilakukan tiga analisa, yaitu analisa pertumbuhan mikroorganisme yang dilakukan dengan metode *direct microscopic count* dengan *counting chamber*

(hemasitometer), analisa kadar gula reduksi yang dilakukan dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 540 nm dengan DNS, dan analisa kadar etanol dengan metode GC (Gas Chromatography). Tahap terakhir adalah melakukan optimasi dengan metode RSM (*Response Surface Methodology*) dengan menggunakan *software* Minitab® 16.1.1.

IV.1 Fermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae*

IV.1.1 Pertumbuhan Sel

Saccharomyces cerevisiae adalah fungi uniseluler, tidak berklorofil, eukariotik, dan termasuk dalam kelompok *Eumycetes*. Khamir ini paling banyak digunakan untuk produksi etanol karena mempunyai toleransi yang tinggi terhadap alkohol, laju fermentasi yang cepat, dan menghasilkan *yield* etanol yang tinggi (Kotter dan Ciriacy, 1993). Kelebihan lain dari khamir ini adalah mudah ditemukan, mudah beradaptasi, cepat berkembangbiak, bersifat stabil, dan tahan terhadap suhu tinggi. *Saccharomyces cerevisiae* mengandung tiga enzim yang berkaitan langsung dengan proses fermentasi yaitu maltase, invertase, dan zimase. Enzim maltase berfungsi mengubah maltosa menjadi glukosa. Enzim invertase berfungsi mengubah sukrosa menjadi fruktosa dan galaktosa. Sementara enzim zimase berfungsi mengubah fruktosa dan glukosa menjadi karbon dioksida. Mikroorganisme ini dapat memfermentasi sukrosa, glukosa, dan fruktosa. Oleh karena itu, mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* digunakan dalam penelitian ini. Berikut merupakan kurva pertumbuhan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dalam starter yang terdiri dari nira siwalan dan nutrisi.

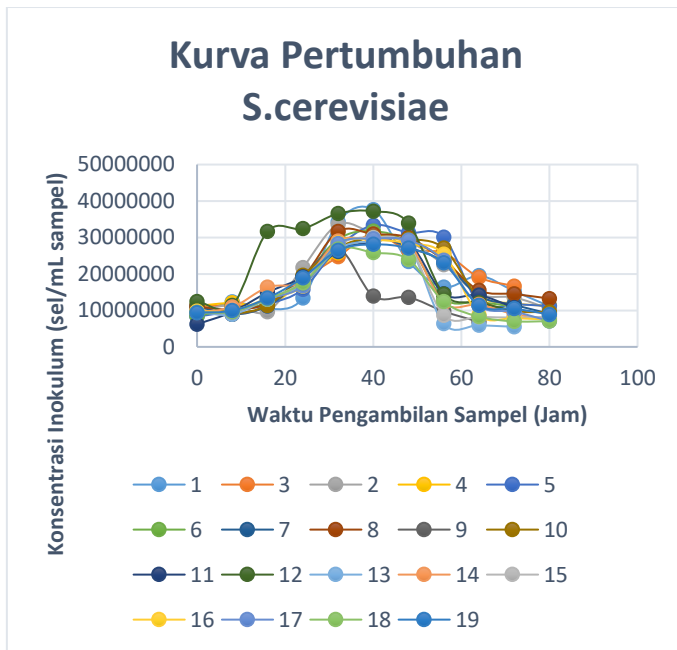


Gambar 4.1 Kurva Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*

Gambar 4.1 merupakan grafik pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dalam starter yang berisi 180 ml nira siwalan dengan konsentrasi gula awal 139.57 g/L, 1 g KH_2PO_4 , 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g *yeast extract*. Pada fermentasi *batch* dikarenakan tidak adanya aliran masuk atau keluar fermentor, konsentrasi sel dan substrat akan bervariasi terhadap waktu. Fase awal (*lag phase*) terjadi pada jam ke 0-2 dimana pertumbuhan sel cenderung konstan dikarenakan sel masih beradaptasi pada media pertumbuhan baru. Pada jam ke 2-7 merupakan fase dimana mikroorganisme mulai tumbuh dan berlipat ganda, fase ini dinamakan *log phase*. Mikroorganisme sudah beradaptasi dengan media pertumbuhan sehingga tumbuh dengan sangat cepat. Konsumsi nutrisi sampai pada titik dimana terlalu banyak sel tetapi tidak ada cukup nutrisi untuk mempertahankan pertumbuhan yang cepat sehingga mikroorganisme mulai memasuki fase pertumbuhan stagnan (*stationary phase*) yang terjadi pada jam ke 8-11. Konsentrasi

substrat yang semakin sedikit menyebabkan mikroorganisme mulai memasuki fase kematian (*death/endogenous phase*) yang terjadi mulai dari jam ke-11. Karena keterbatasan cadangan makanan, pada fase kematian sel menggunakan energi ATP (Adenosin Trifosfat) yang tersimpan untuk respirasi dan pergerakan sampai cadangan ATP habis dan sel mati (Sundstrom dan Klei, 1979).

Pertumbuhan mikroorganisme juga diamati selama proses fermentasi berlangsung. Pengamatan dilakukan dengan metode *counting chamber* menggunakan *haemocytometer* setiap 8 jam selama waktu fermentasi. Berikut hasil pengamatan pertumbuhan mikroorganisme selama proses fermentasi berlangsung.



Gambar 4.2 Kurva Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* Selama Proses Fermentasi

Dari gambar di atas dapat dilihat bahwa secara keseluruhan kurva pertumbuhan mikroorganisme selama proses fermentasi

mengalami keempat fase yaitu *lag phase* (fase pertumbuhan awal), *log phase* (fase pertumbuhan berlipat ganda), *stationary phase* (fase pertumbuhan stagnan), dan *endogenous phase* (fase kematian) seperti yang terjadi pada saat pembuatan starter.

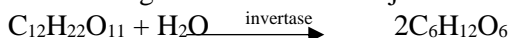
Secara umum, pertumbuhan mikroorganisme tertinggi, terjadi pada kondisi media pertumbuhan mempunyai pH 4.5. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa pH optimal untuk proses fermentasi produksi etanol adalah 4-5 (Lin, dkk., 2012).

Pertumbuhan mikroorganisme tercepat terjadi pada Run-12, hal ini dikarenakan jumlah inokulum yang masuk ke dalam substrat merupakan yang terbanyak. Sedangkan pada Run-9 pertumbuhan mikroorganisme sangat sedikit. Hal ini dikarenakan kondisi substrat yang kurang mendukung pertumbuhan mikroorganisme.

IV.1.2 Analisa Gula Reduksi

Pada tahap awal fermentasi mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan enzim *invertase* yang berfungsi mengubah sukrosa menjadi glukosa. Kemudian dengan bantuan enzim *zymase*, glukosa diubah menjadi etanol (Atkinson, 1983). Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:

a) Reaksi Penguraian Sukrosa Menjadi Glukosa dan Fruktosa

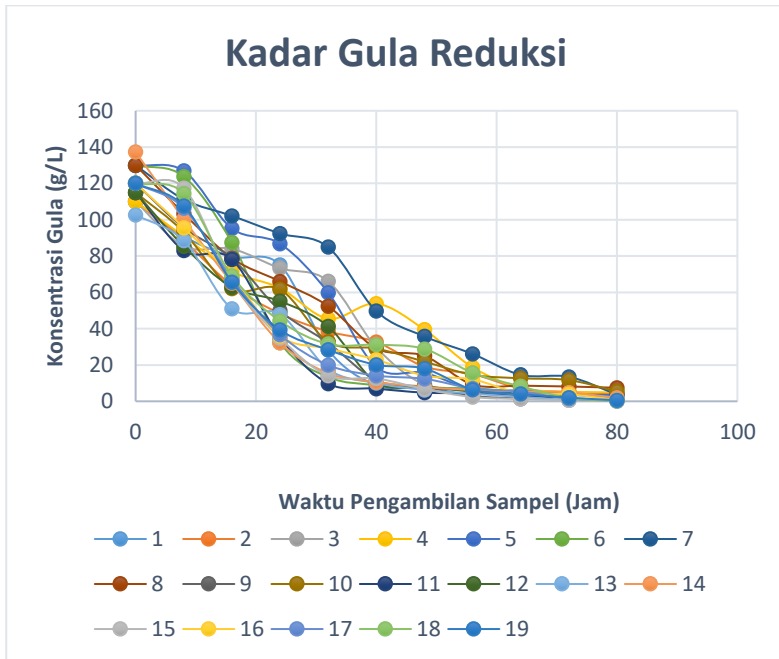


b) Reaksi Pembentukan Etanol



Pada penelitian ini, kadar gula reduksi dianalisa dengan metode DNS (asam 3,5 – dinitrosalisilat). Sebanyak 2 mL sampel dari setiap run yang telah dicampurkan dengan 3 mL larutan DNS, dipanaskan selama 10 menit dan didinginkan selama 10 menit hingga mencapai suhu *ambient*. Kemudian larutan tersebut dianalisa dengan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh dari analisa menggunakan spektrofotometri dimasukkan ke dalam persamaan

pada kurva standard glukosa. Berikut grafik hasil analisa kadar gula reduksi dengan metode DNS.



Gambar 4.3 Kadar Gula Reduksi pada Proses Fermentasi menggunakan Mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae*

Dari grafik terlihat bahwa pada keseluruhan variabel run, kadar gula reduksi turun seiring lamanya waktu fermentasi. Hal ini terjadi karena konversi gula menjadi etanol oleh enzim *zymase*, seperti pada reaksi di atas. Selain itu, gula juga menjadi sumber utama karbon yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroorganisme dan mensintesis energi yang digunakan dalam proses fermentasi (Thompson, dkk., 2001).

IV.1.3 Optimasi

Optimasi dilakukan dengan *software* Minitab® menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM). Untuk mendeskripsikan respon permukaan di daerah optimum, dilakukan 2^3 faktorial *Central Composite Design* (CCD) dengan 6 titik *star design* ($\alpha=1.73$), dan 5 titik replikasi.

Pada fermentasi *batch* dengan substrat nira siwalan, variasi pH, konsentrasi inokulum, dan konsentrasi substrat cukup berpengaruh pada konsentrasi etanol yang dihasilkan. Setiap variabel independen, ditentukan dua konsentrasi yang efektif untuk mencari titik optimum. Berikut adalah variabel eksperimen yang dilakukan pada fermentasi menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabel 4.2 Variabel Eksperimen pada Fermentasi Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*

Faktor	Variabel	Coded Factor					
		Unit	$-\sqrt{3}$	-1	0	1	$\sqrt{3}$
A	pH	-	3.77	4.5	5.5	6.5	7.23
B	Jumlah Inokulum	jumlah sel	6821363	8075000	9787500	11500000	12753637
C	Konsentrasi Gula	g/L	102.68	110	120	130	137.32

Dari tabel di atas dilakukan design dengan CCD sehingga diperoleh variasi untuk ketiga variabel independen dalam eksperimen.

Tabel 4.3 Matriks CCD untuk Eksperimen *Saccharomyces cerevisiae*

Run Order	pH	Konsentrasi Inokulum (sel/mL)	Konsentrasi Gula (g/L)
1	4.5	8075000	110
2	6.5	8075000	110
3	4.5	11500000	110
4	6.5	11500000	110
5	4.5	8075000	130
6	6.5	8075000	130
7	4.5	11500000	130
8	6.5	11500000	130
9	3.77	9787500	120
10	7.23	9787500	120
11	5.5	6821363	120
12	5.5	12753637	120
13	5.5	9787500	102.68
14	5.5	9787500	137.32
15	5.5	9787500	120
16	5.5	9787500	120
17	5.5	9787500	120
18	5.5	9787500	120
19	5.5	9787500	120

Respon kadar etanol diambil setelah kadar gula dalam substrat habis atau hingga waktu maksimal fermentasi 90 jam. Respon dianalisa dengan metode ANOVA (*Analysis of Variance*) dan analisa estimasi model dilakukan dengan Lack of Fit Test. Lack of Fit adalah keadaan dimana regresi linier sederhana tidak cukup sesuai dengan data (Ghosh, dkk., 2011). Kemungkinan

model prediksi yang diperoleh adalah *linear*, *two factor interaction*, dan *full quadratic*. Jika *P value* dari lack of fit model signifikan ($p < 0.05$) maka dibutuhkan model yang lebih kompleks. Nilai *P value* yang diperoleh adalah 0.707 sehingga $p > 0.05$ yang artinya lack of fit model tidak signifikan. Hal ini menandakan bahwa model eksperimen *full quadratic* signifikan secara statistik. Persamaan polinomial orde dua yang didapat untuk memprediksi kadar etanol adalah:

$$\hat{Y} = 0.1931 + 0.1826 X_1 + 1.4973 \times 10^{-7} X_2 - 0.0215 X_3 - 0.0203 X_1^2 + 5.3935 \times 10^{-16} X_2^2 + 0.0001 X_3^2 - 6.4963 \times 10^{-10} X_1 X_2 + 0.0002 X_1 X_3 - 1.2211 \times 10^{-9} X_2 X_3$$

Tabel 4.4 Signifikansi Statistik dari Koefisien Regresi Produksi Etanol dengan *Saccharomyces cerevisiae*

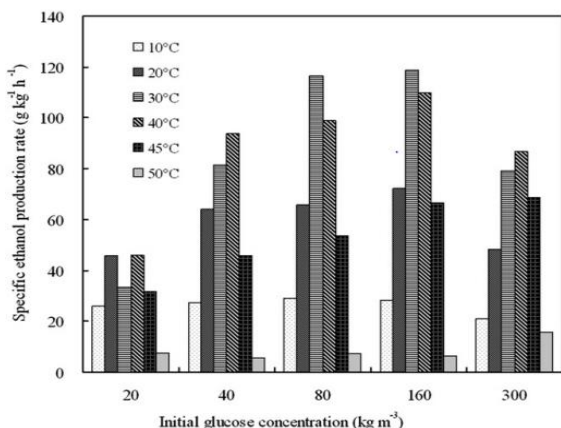
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	0.026004	0.026004	0.002889	4.51	0.018
Linear	3	0.011724	0.011724	0.003908	6.10	0.015
pH	1	0.007229	0.007229	0.007229	11.29	0.008
C Inokulum	1	0.004245	0.004245	0.004245	6.63	0.030
C Gula	1	0.000250	0.000250	0.000250	0.39	0.548
Square	3	0.010738	0.010738	0.003579	5.59	0.019
pH*pH	1	0.007961	0.006133	0.006133	9.58	0.013
C Inokulum*C Inokulum	1	0.000009	0.000037	0.000037	0.06	0.815
C Gula*C Gula	1	0.002767	0.002767	0.002767	4.32	0.067
Interaction	3	0.003543	0.003543	0.001181	1.84	0.210
pH*C Inokulum	1	0.000010	0.000010	0.000010	0.02	0.904
pH*C Gula	1	0.000034	0.000034	0.000034	0.05	0.823
C Inokulum*C Gula	1	0.003499	0.003499	0.003499	5.46	0.044
Residual Error	9	0.005765	0.005765	0.000641		
Lack-of-Fit	5	0.002476	0.002476	0.000495	0.60	0.707
Pure Error	4	0.003289	0.003289	0.000822		
Total	18	0.031769				

Tabel 4.4 menunjukkan respon dari variabel pH, konsentrasi inokulum, pH^2 , dan konsentrasi gula x konsentrasi inokulum signifikan dengan *P value* < 0.05. Sementara konsentrasi gula, konsentrasi inokulum², konsentrasi gula², pH x konsentrasi inokulum, dan pH x konsentrasi gula tidak signifikan karena *P*

$value > 0.05$. Kebanyakan nilai di atas signifikan sehingga keseluruhan model menjadi signifikan.

Variabel konsentrasi gula mempunyai signifikansi di atas 0.05. Hal ini dikarenakan *range* dari konsentrasi gula yang sempit, yaitu 110 g/L dan 130 g/L. Seharusnya konsentrasi gula yang digunakan adalah 100 g/L dan 150 g/L, tetapi karena keterbatasan bahan baku yang hanya mengandung 139.37 g/L gula maka *rangennya* dipersempit.

Lin, dkk (2011) melakukan penelitian mengenai produksi etanol menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dengan konsentrasi gula 20 g/L, 40 g/L, 80 g/L, 160 g/L, dan 300 g/L. Konsentrasi etanol tertinggi diperoleh pada variabel konsentrasi gula 80 g/L dan 160 g/L, pada suhu 30 °C dan waktu inkubasi 72 jam. Sehingga agar konsentrasi gula mempunyai pengaruh yang signifikan diperlukan *range* yang lebih besar karena nilai 110 g/L dan 130 g/L masih terdapat dalam *range* optimum konsentrasi gula untuk produksi etanol.



Gambar 4.4 Hasil Konsentrasi Etanol dari Penelitian Lin, dkk (2011)

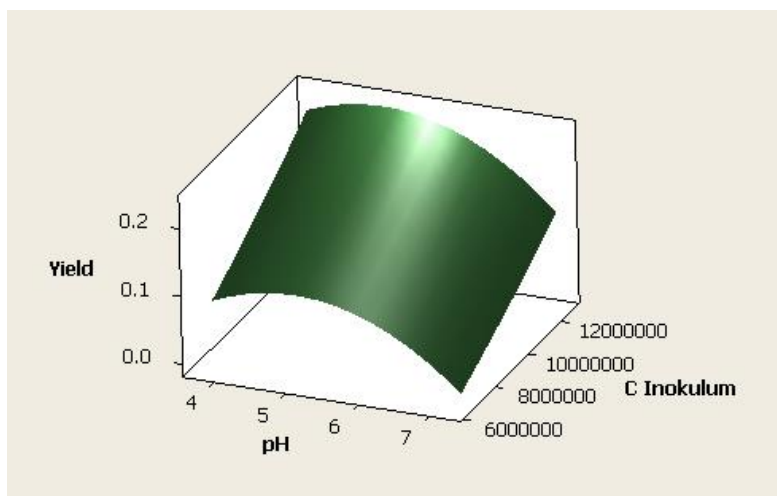
Penelitian Humaidah, dkk (2017) mengatakan bahwa konsentrasi gula optimum untuk produksi etanol menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* adalah 104.452 g/L. Koefisien determinasi (R^2) = 0.8185 yang berarti 81.85% variasi sampel pada kadar etanol berkaitan dengan variabel independen. Nilai ini juga mengindikasikan bahwa 18.15% dari variasi tidak dapat dijabarkan oleh model. Dapat dikatakan bahwa model regresi sesuai untuk memprediksikan nilai optimum kadar etanol karena terdapat selisih yang kecil antara nilai eksperimental dan prediktif (Chrisnasari, dkk., 2011). Nilai *yield* eksperimen dan prediktif disajikan dalam tabel berikut:

Tabel 4.5 Yield Etanol Eksperimen dan Prediktif untuk *Saccharomyces cerevisiae*

No	pH	C Gula	Jlh Inokulum	Y	\hat{Y}
1	4.5	110	8075000	0.1360	0.1228
2	6.5	110	8075000	0.0762	0.0754
3	4.5	110	11500000	0.2123	0.2017
4	6.5	110	11500000	0.1399	0.1499
5	4.5	130	8075000	0.1935	0.1688
6	6.5	130	8075000	0.1338	0.1296
7	4.5	130	11500000	0.1780	0.1640
8	6.5	130	11500000	0.1220	0.1204
9	3.77	120	9787500	0.0990	0.1251
10	7.23	120	9787500	0.0585	0.0465
11	5.5	120	6821363	0.1065	0.1212
12	5.5	120	12753637	0.1822	0.1816
13	5.5	102.68	9787500	0.1816	0.1805
14	5.5	137.32	9787500	0.1794	0.1948
15	5.5	120	9787500	0.1237	0.1467
16	5.5	120	9787500	0.1321	0.1467

17	5.5	120	9787500	0.1332	0.1467
18	5.5	120	9787500	0.1945	0.1467
19	5.5	120	9787500	0.1560	0.1467

Bedasarkan koefisien regresi ditentukan nilai optimum pH, konsentrasi inokulum, dan kadar etanol. Hasil yang diperoleh dalam studi ini adalah *yield* optimum 0.2368 (g/g) akan diperoleh pada pH 4.8, konsentrasi inokulum 12,740,970 sel/mL, dan konsentrasi gula 110 gr/L. Hasil optimasi dengan *Response Surface Methodology* disajikan pada Gambar 4.4.



Gambar 4.5 Grafik *Response Surface* Optimasi Yield Etanol untuk *Saccharomyces cerevisiae*

Nilai pH 4.8 untuk mendapatkan *yield* optimum sesuai dengan penelitian terdahulu oleh Lin, dkk (2012) yang mengatakan bahwa range pH optimal untuk produksi etanol melalui proses fermentasi adalah 4-5. Menurut Lin, kadar gula tidak terlalu berpengaruh signifikan terhadap produksi etanol jika tidak

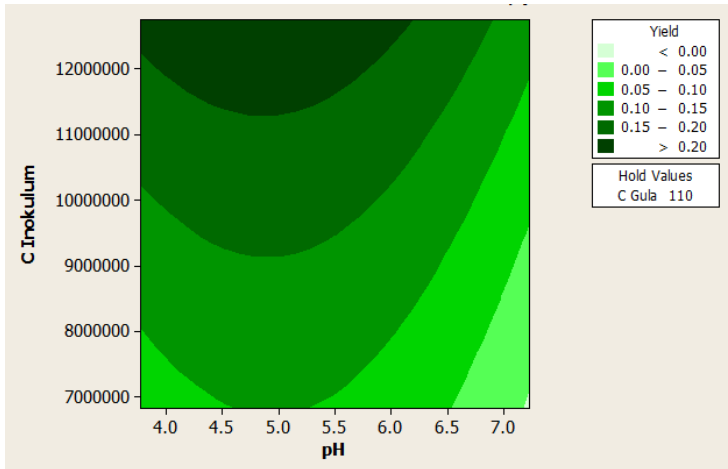
dilakukan kontrol pH. Pada $\text{pH} < 4$ pembentukan asam asetat akan meningkat, sedangkan jika $\text{pH} > 5$ akan terbentuk asam butirat.

Kadar gula untuk mendapatkan kondisi yang optimal adalah 110 gr/L, merupakan yang terendah pada “coded factor” yang dilakukan dalam eksperimen. Pada *yeast* seperti *Saccharomyces cerevisiae*, etanol diproduksi ketika konsentrasi gula relatif rendah bahkan dalam kondisi aerobik (Agbogbo dan Kelly, 2008). Pendapat lain adalah dari FAO yang mengatakan bahwa *yeast* berkembang baik pada larutan yang memiliki konsentrasi gula 40% dan jika lebih tinggi *yeast* tetap bisa berkembang biak namun tidak terlalu baik. Karena nira yang memiliki kadar gula tinggi bersifat sangat asam. Tingkat keasaman dan kadar gula yang tinggi menciptakan lingkungan yang tidak baik untuk perkembangan mikroorganisme. Tingginya kadar gula juga menghambat laju fermentasi (Fernanda dan Ravindran, 1990).

Dari tabel 4.4 dapat dilihat bahwa faktor interaksi antara $\text{pH} \times$ konsentrasi inokulum dan $\text{pH} \times$ konsentrasi gula memiliki p value > 0.05 yang berarti tidak signifikan. Menurut Buzes, dkk (1998) *Saccharomyces cerevisiae* dapat tumbuh pada range pH 3.5 – 5.5, sehingga variasi pH tidak terlalu berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisme karena range pH yang digunakan masih di dalam range pH pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Hal ini juga dapat dilihat dari permukaan grafik respon, dimana *yield* akan meningkat dari $\text{pH} < 4$ sampai sekitar pH 5.5 dan kemudian akan menurun setelah dikarenakan pada $\text{pH} > 5.5$ bukan termasuk dalam range pH untuk pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Faktor interaksi $\text{pH} \times$ konsentrasi gula juga tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap *yield* etanol dikarenakan range pH alami dari nira siwalan adalah 4 – 6 yang juga merupakan range pH yang digunakan sebagai variabel dalam eksperimen ini sehingga tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap laju fermentasi, serta menyebabkan pelepasan zat sintetis maupun zat aromatik (Humaidah, dkk., 2017). Selain itu, range pH maupun konsentrasi gula yang tidak terlalu jauh menyebabkan faktor interaksi antara keduanya tidak signifikan.

Dari grafik respon permukaan di atas dapat dilihat bahwa pada kondisi konsentrasi inokulum yang sama, yang menghasilkan *yield* optimal, jika pH menurun atau naik akan terjadi penurunan *yield* produksi. Hal ini dikarenakan aktivitas enzim mikroorganisme dipengaruhi oleh kondisi pH substrat (Ghosh, dkk., 2011). Juga pada kondisi pH yang sama, yang menghasilkan *yield* optimal, jika konsentrasi inokulum turun akan terjadi penurunan *yield* produksi. Hal ini dikarenakan semakin banyak inokulum yang masuk semakin cepat proses konversi gula menjadi etanol dan semakin banyak etanol yang terbentuk. Nilai konsentrasi gula dijadikan *hold value* karena dari hasil ANOVA, nilai $P\ value > 0.05$ yang artinya tidak signifikan.

Menurut Bezerra, dkk (2008) tipe permukaan pada gambar 4.5 menunjukkan titik optimal berada di luar daerah eksperimen. Dari grafik terlihat bahwa adanya lengkungan pada variabel konsentrasi inokulum dan pH menunjukkan bahwa variasi level berpengaruh. Titik puncak konsentrasi inokulum dan pH masih terdapat pada rentang daerah eksperimen, sementara titik puncak permukaan respon untuk *yield* etanol terdapat di luar rentang daerah eksperimen yang menandakan produksi etanol dapat ditingkatkan lagi melebihi *yield* yang diperoleh dari eksperimen (Bezerra, dkk., 2008).



Gambar 4.6 Kontur Plot Optimasi Yield Etanol untuk *Saccharomyces cerevisiae*

Setelah dilakukan eksperimen untuk kondisi optimum fermentasi, diperoleh *yield* etanol sebesar 0.2221 (g/g). Nilai ini lebih kecil dari *yield* prediktif yaitu 0.2368 (g/g). Hasil yang diperoleh memiliki persentase error 6.2%. Hal ini dikarenakan kurangnya keakuratan dalam melakukan eksperimen. Tetapi nilai *yield* yang diperoleh masih lebih tinggi dari keseluruhan nilai yang diperoleh masih lebih tinggi dari keseluruhan nilai *yield* 19 run eksperimen sebelumnya

IV.2 Fermentasi oleh *Mixed Culture*

IV.2.1 Pertumbuhan Sel

Mikroorganisme yang digunakan dalam fermentasi oleh *mixed culture* adalah *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*. Kedua mikroorganisme ini dibiakkan dalam starter dengan perbandingan 1:1 (masing-masing 1 ose).

Pichia stipitis (a.k.a. *Scheffersomyces stipitis*) termasuk dalam kelompok fungi “brewer’s yeast” bersama *Saccharomyces cerevisiae* yang berguna untuk fermentasi alkohol. *Pichia stipitis*

adalah mikroorganisme yang secara alami dapat memiliki kemampuan memfermentasi xylosa dan arabinosa (pentosa) atau biomassa berlignosulosa menjadi etanol. *Pichia stipitis* juga dapat memfermentasi glukosa, manosa, galaktosa, dan seobiosa (Parekh dan Wayman, 1986). Pada kondisi operasi fermentasi yang sama *Pichia stipitis* lebih menyukai glukosa daripada xylosa untuk produksi etanol, dimana laju konsumsi glukosa lebih tinggi daripada xylosa (Agbogbo, dkk., 2006). Menurut penelitian Widjaja, dkk., (2014) konsentrasi etanol yang dihasilkan melalui fermentasi dengan menggunakan campuran mikroorganisme *Pichia stipitis* dan *Saccharomyces cerevisiae* lebih baik daripada menggunakan kultur murni masing-masing mikroorganisme tersebut. Berikut adalah kurva pertumbuhan *mixed culture* antara *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*.



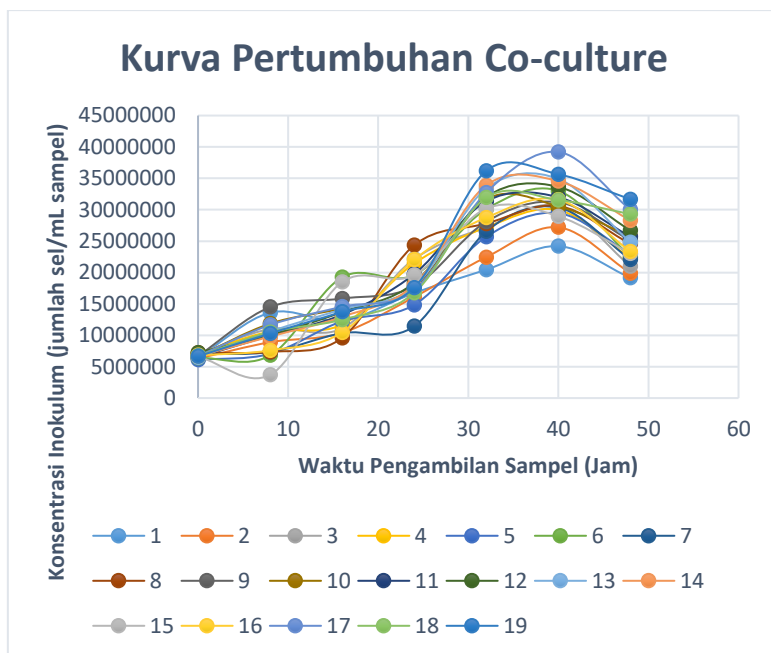
Gambar 4.7 Kurva Pertumbuhan *Mixed Culture*

Pada fermentasi *batch* dikarenakan tidak adanya aliran masuk atau keluar fermentor, konsentrasi sel dan substrat akan bervariasi terhadap waktu. Fase awal (*lag phase*) terjadi pada jam ke 0-2 dimana pertumbuhan sel cenderung konstan dikarenakan sel masih

beradaptasi pada media pertumbuhan baru. Pada jam ke 2-8 merupakan fase dimana mikroorganisme mulai tumbuh dan berlipat ganda, fase ini dinamakan *log phase*. Mikroorganisme sudah beradaptasi dengan media pertumbuhan sehingga tumbuh dengan sangat cepat. Konsumsi nutrisi sampai pada titik dimana terlalu banyak sel tetapi tidak ada cukup nutrisi untuk mempertahankan pertumbuhan yang cepat sehingga mikroorganisme mulai memasuki fase pertumbuhan stagnan (*stationary phase*) yang terjadi pada jam ke 8-10. Konsentrasi substrat yang semakin sedikit menyebabkan mikroorganisme mulai memasuki fase kematian (*death/endogenous phase*) yang terjadi mulai dari jam ke-10. Karena keterbatasan cadangan makanan, pada fase kematian sel menggunakan energi ATP (Adenosin Trifosfat) yang tersimpan untuk respirasi dan pergerakan sampai cadangan ATP habis dan sel mati (Sundstrom dan Klei, 1979).

Pertumbuhan mikroorganisme juga diamati selama proses fermentasi berlangsung. Pengamatan dilakukan dengan metode *counting chamber* menggunakan *haemocytometer* setiap 8 jam selama waktu fermentasi. Berikut hasil pengamatan pertumbuhan mikroorganisme selama proses fermentasi berlangsung.

Gambar 4.7 merupakan grafik pertumbuhan mikroorganisme *mixed culture* selama proses fermentasi berlangsung. Proses fermentasi berlangsung selama 48 jam. Grafik pertumbuhan mikroorganisme *mixed culture* selama proses fermentasi secara umum sama seperti pada kurva pertumbuhan di starter, dimana mikroorganisme mengalami 4 fase yaitu fase pertumbuhan awal (*lag phase*), fase pertumbuhan berlipat ganda (*log phase*), fase pertumbuhan stagnan (*stationary phase*), dan fase kematian (*endogenous phase*).



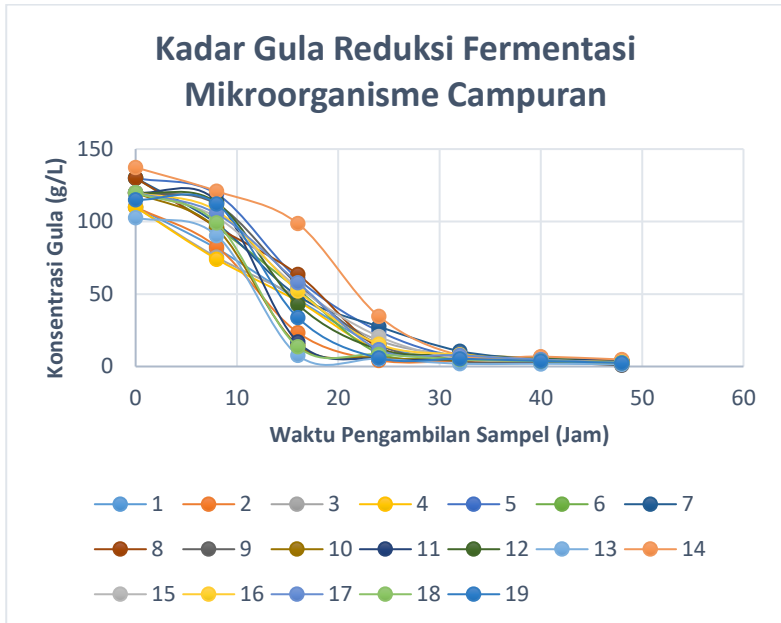
Gambar 4.8 Kurva Pertumbuhan *Mixed Culture* Selama Proses Fermentasi

IV.2.2 Analisa Gula Reduksi

Saccharomyces cerevisiae memfermentasi gula menjadi etanol heksosa dengan sangat cepat dan mempunyai ketahanan yang tinggi. Sementara *Pichia stipitis* mampu memfermentasi baik gula heksosa (glukosa, galaktosa, dan manosa), gula pentose (xylosa), dan disakarida (selobiosa) menjadi etanol (Parekh dan Wayman, 1986). Dengan digabungkannya kedua mikroorganisme tersebut diharapkan gula yang terkonversi menjadi etanol lebih banyak sehingga meningkatkan *yield* produksi.

Pada penelitian ini, kadar gula reduksi dianalisa dengan metode DNS (asam 3,5 – dinitrosalisilat). Sebanyak 2 mL sampel dari setiap run yang telah dicampurkan dengan 3 mL larutan DNS, dipanaskan selama 10 menit dan didinginkan selama 10 menit

hingga mencapai suhu *ambient*. Kemudian larutan tersebut dianalisa dengan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh dari analisa menggunakan spektrofotometri dimasukkan ke dalam persamaan pada kurva standard glukosa.



Gambar 4.9 Kadar Gula Reduksi pada Proses Fermentasi *Mixed Culture*

Dari grafik terlihat bahwa kadar gula turun seiring lamanya waktu fermentasi. Hal ini terjadi karena konversi gula menjadi etanol. Semakin lama waktu fermentasi, semakin besar jumlah gula yang terkonversi menjadi etanol. Selain itu, gula juga menjadi sumber utama karbon yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroorganisme dan mensintesis energi yang digunakan dalam proses fermentasi (Thompson, dkk., 2001).

IV.2.3 Optimasi

Optimasi dilakukan dengan *software* Minitab® menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM). Untuk mendeskripsikan respon permukaan di daerah optimum, dilakukan 2^3 faktorial *Central Composite Design* (CCD) dengan 6 titik *star design* ($\alpha=1.73$), dan 5 titik replikasi.

Pada fermentasi *batch* dengan substrat nira siwalan, variasi pH, konsentrasi inokulum, dan konsentrasi substrat cukup berpengaruh pada konsentrasi etanol yang dihasilkan. Setiap variabel independen, ditentukan dua konsentrasi yang efektif untuk mencari titik optimum. Berikut adalah variabel eksperimen yang dilakukan pada fermentasi menggunakan mikroorganisme *mixed culture*.

Tabel 4.6 Variabel Eksperimen pada Fermentasi Menggunakan *Mixed Culture*

Faktor	Variabel	Coded Factor					
		Unit	$-\sqrt{3}$	-1	0	1	$\sqrt{3}$
A	pH	-	3.77	4.5	5.5	6.5	7.23
B	Jumlah Inokulum	jumlah sel	6171234	6400000	6712500	7025000	7253766
C	Konsentrasi Gula	g/L	102.68	110	120	130	137.32

Dari tabel di atas dilakukan design dengan CCD sehingga diperoleh variasi untuk ketiga variabel independen dalam eksperimen.

Tabel 4.7 Matriks CCD untuk Eksperimen *Mixed Culture*

Run Order	pH	Konsentrasi Inokulum (sel/mL)	Konsentrasi Gula (g/L)
1	4.5	6400000	110
2	6.5	6400000	110
3	4.5	7025000	110

4	6.5	7025000	110
5	4.5	6400000	130
6	6.5	6400000	130
7	4.5	7025000	130
8	6.5	7025000	130
9	3.77	6712500	120
10	7.23	6712500	120
11	5.5	6171234	120
12	5.5	7253766	120
13	5.5	6712500	102.68
14	5.5	6712500	137.32
15	5.5	6712500	120
16	5.5	6712500	120
17	5.5	6712500	120
18	5.5	6712500	120
19	5.5	6712500	120

Respon kadar etanol diambil setelah kadar gula dalam substrat habis atau hingga waktu maksimal fermentasi 90 jam. Respon dianalisa dengan metode ANOVA (*Analysis of Variance*) dan analisa estimasi model dilakukan dengan Lack of Fit Test. Lack of Fit adalah keadaan dimana regresi linier sederhana tidak cukup sesuai dengan data (Ghosh, dkk., 2011). Kemungkinan model prediksi yang diperoleh adalah *linear*, *two factor interaction*, dan *full quadratic*. Jika *P value* dari lack of fit model signifikan ($p < 0.05$) maka dibutuhkan model yang lebih kompleks. Nilai *P value* yang diperoleh adalah 0.109 sehingga $p > 0.05$ yang artinya lack of fit model tidak signifikan. Hal ini menandakan bahwa model eksperimen *full quadratic* signifikan secara statistik. Persamaan polinomial orde dua yang didapat untuk memprediksi kadar etanol adalah:

$$\hat{Y} = 9.2896 + 0.3144 X_1 - 4.4359 \times 10^{-7} X_2 - 0.1512 X_3 - 0.0225 X_1^2 + 8.1275 \times 10^{-14} X_2^2 + 0.0007 X_3^2 - 1.4840 \times 10^{-8} X_1 X_2 + 1.8750 \times 10^{-5} X_1 X_3 - 3.0760 \times 10^{-9} X_2 X_3$$

Tabel 4.8 Signifikansi Statistik dari Koefisien Regresi Produksi Etanol dengan *Mixed Culture*

Analysis of Variance for Yield

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	0.161623	0.161623	0.017958	8.86	0.002
Linear	3	0.065912	0.065912	0.021971	10.84	0.002
pH	1	0.012812	0.012812	0.012812	6.32	0.033
C Inokulum	1	0.052891	0.052891	0.052891	26.09	0.001
C Gula	1	0.000209	0.000209	0.000209	0.10	0.755
Square	3	0.094799	0.094799	0.031600	15.59	0.001
pH*pH	1	0.018255	0.007497	0.007497	3.70	0.087
C Inokulum*C Inokulum	1	0.000298	0.000934	0.000934	0.46	0.514
C Gula*C Gula	1	0.076247	0.076247	0.076247	37.61	0.000
Interaction	3	0.000912	0.000912	0.000304	0.15	0.927
pH*C Inokulum	1	0.000172	0.000172	0.000172	0.08	0.777
pH*C Gula	1	0.000000	0.000000	0.000000	0.00	0.991
C Inokulum*C Gula	1	0.000739	0.000739	0.000739	0.36	0.561
Residual Error	9	0.018246	0.018246	0.002027		
Lack-of-Fit	5	0.015082	0.015082	0.003016	3.81	0.109
Pure Error	4	0.003164	0.003164	0.000791		
Total	18	0.179868				

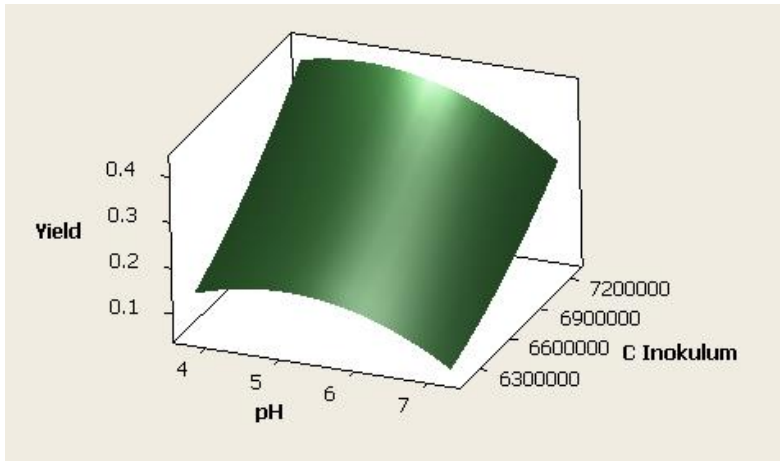
Tabel 4.8 menunjukkan respon dari variabel pH, konsentrasi inokulum, pH², konsentrasi gula², dan konsentrasi inokulum² signifikan dengan *P value* < 0.05. Sementara konsentrasi gula, pH x konsentrasi gula, pH x konsentrasi inokulum, dan konsentrasi gula x konsentrasi inokulum tidak signifikan karena *P value* > 0.05. Kebanyakan nilai di atas signifikan sehingga keseluruhan model menjadi signifikan.

Koefisien determinasi (R^2) = 0.8986 yang berarti 89.86% variasi sampel pada kadar etanol berkaitan dengan variabel independen. Nilai ini juga mengindikasikan bahwa 10.14% dari variasi tidak dapat dijabarkan oleh model. Dapat dikatakan bahwa model regresi sesuai untuk memprediksikan nilai optimum kadar etanol karena terdapat selisih yang kecil antara nilai eksperimental dan prediktif (Chrisnasari, dkk., 2011). Nilai *yield* eksperimen dan prediktif disajikan dalam tabel berikut:

Tabel 4.9 Yield Etanol Eksperimen dan Prediktif untuk *Mixed Culture*

Run	pH	Jlh Inokulum	C Gula	Y	\hat{Y}
1	4.5	6400000	110	0.2636	0.2090
2	6.5	6400000	110	0.1579	0.1481
3	4.5	7025000	110	0.3394	0.3512
4	6.5	7025000	110	0.2833	0.2903
5	4.5	6400000	130	0.2577	0.2356
6	6.5	6400000	130	0.2209	0.1754
7	4.5	7025000	130	0.3632	0.3393
8	6.5	7025000	130	0.2397	0.2792
9	3.77	6712500	120	0.1420	0.1814
10	7.23	6712500	120	0.0835	0.0767
11	5.5	6171875	120	0.0493	0.1137
12	5.5	7253125	120	0.3583	0.3265
13	5.5	6712500	102.7	0.3898	0.4043
14	5.5	6712500	137.3	0.3995	0.4176
15	5.5	6712500	120	0.2045	0.1964
16	5.5	6712500	120	0.2144	0.1964
17	5.5	6712500	120	0.2269	0.1964
18	5.5	6712500	120	0.1791	0.1964
19	5.5	6712500	120	0.1571	0.1964

Bedasarkan koefisien regresi ditentukan nilai optimum pH, konsentrasi inokulum, dan kadar etanol. Hasil yang diperoleh dalam studi ini adalah *yield* optimum 0.4269 (g/g) akan diperoleh pada pH 5, konsentrasi inokulum 7,251,454 sel/mL, dan konsentrasi gula 110 g/L. Hasil optimasi dengan *Response Surface Methodology* disajikan pada Gambar 4.9.



Gambar 4.10 Grafik *Response Surface* Optimasi Yield Etanol untuk *Mixed Culture*

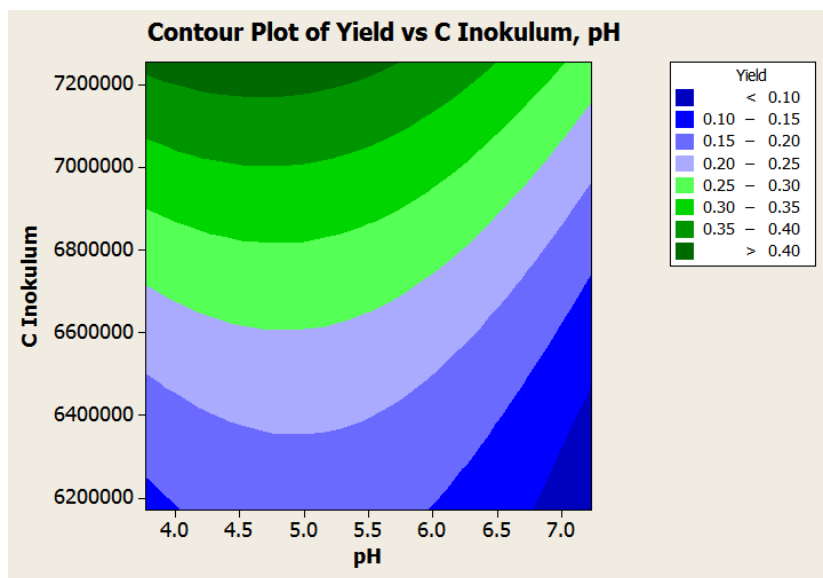
Nilai pH 5.0 untuk mendapatkan *yield* optimum sesuai dengan penelitian terdahulu oleh Agbogbo dan Kelly (2008) yang menyatakan bahwa *yield* optimum untuk pertumbuhan *Pichia stipitis* adalah 4.5 – 5.5. Nilai pH 5.0 ini juga sesuai untuk mikroorganisme *Pichia stipitis*. Sesuai dengan penelitian terdahulu oleh Lin, dkk (2012) yang mengatakan bahwa *range* pH optimal untuk produksi etanol melalui proses fermentasi dengan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* adalah 4.0-5.0. Kadar gula untuk mendapatkan kondisi yang optimal adalah 110 gr/L, merupakan yang tertinggi pada “coded factor” yang dilakukan dalam eksperimen. Pada *yeast* seperti *Saccharomyces cerevisiae*, etanol diproduksi ketika konsentrasi gula relatif rendah bahkan dalam kondisi aerobik (Agbogbo dan Kelly, 2008). Tetapi *Pichia stipitis* merupakan mikroorganisme yang tahan terhadap kadar gula tinggi, namun tingkat ketahanannya terhadap etanol rendah (Rouhollah, dkk., 2007). Sehingga campuran kedua mikroorganisme tersebut dapat memfermentasi kadar gula yang lebih tinggi.

Dari tabel 4.8 dapat dilihat bahwa faktor interaksi antara pH x konsentrasi inokulum, pH x konsentrasi gula, dan konsentrasi gula x konsentrasi inokulum memiliki p value > 0.05 yang berarti tidak signifikan. Menurut Buzes, dkk (1998) *Saccharomyces cerevisiae* dapat tumbuh pada *range* pH 3.5 – 5.5, sehingga variasi pH tidak terlalu berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisme karena *range* pH yang digunakan masih di dalam *range* pH pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Hal ini juga dapat dilihat dari permukaan grafik respon, dimana *yield* akan meningkat dari pH < 4.0 sampai sekitar pH 5.5 dan kemudian akan menurun setelah dikarenakan pada pH > 5.5 bukan termasuk dalam *range* pH untuk pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Begitu juga untuk *Pichia stipitis*, Du Preez (1994) menyatakan bahwa produksi etanol oleh *Pichia stipitis* sangat dipengaruhi oleh pH pada *range* 2.5 – 5.5 dan menjadi optimum pada pH 4.0 – 5.5. Hal ini terlihat dari permukaan grafik respon dimana *yield* etanol semakin tinggi dari pH 4.0 – 5.0. Faktor interaksi pH x konsentrasi gula juga tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap *yield* etanol dikarenakan *range* pH alami dari nira siwalan adalah 4 – 6 yang juga merupakan *range* pH yang digunakan sebagai variabel dalam eksperimen ini sehingga tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap laju fermentasi, serta menyebabkan pelepasan zat sintetis maupun zat aromatik (Humaidah, dkk., 2017). Sementara faktor interaksi antara konsentrasi inokulum dan konsentrasi gula tidak signifikan dikarenakan *Saccharomyces cerevisiae* tidak tahan terhadap kadar gula tinggi (Agbogbo dan Kelly 2008), sementara *Pichia stipitis* merupakan mikroorganisme yang tahan terhadap kadar gula tinggi ((Rouhollah, dkk., 2007).

Dari grafik respon permukaan di atas dapat dilihat bahwa pada kondisi konsentrasi inokulum yang sama, yang menghasilkan *yield* optimal, jika pH menurun atau naik akan terjadi penurunan *yield* produksi. Hal ini dikarenakan aktivitas enzim mikroorganisme dipengaruhi oleh kondisi pH substrat (Ghosh, dkk., 2011). Juga pada kondisi pH yang sama, yang menghasilkan *yield* optimal, jika konsentrasi inokulum turun akan terjadi

penurunan *yield* produksi. Hal ini dikarenakan semakin banyak inokulum yang masuk semakin cepat proses konversi gula menjadi etanol dan semakin banyak etanol yang terbentuk. Nilai konsentrasi gula dijadikan *hold value* karena dari hasil ANOVA, nilai *P value* > 0.05 yang artinya tidak signifikan.

Menurut Bezerra, dkk (2008) tipe permukaan pada gambar 4.9 menunjukkan titik optimal berada di luar daerah eksperimen. Dari grafik terlihat bahwa adanya lengkungan pada variabel konsentrasi inokulum dan pH menunjukkan bahwa variasi level berpengaruh. Titik puncak konsentrasi inokulum dan pH masih terdapat pada rentang daerah eksperimen, sementara titik puncak permukaan respon untuk *yield* etanol terdapat di luar rentang daerah eksperimen yang menandakan produksi etanol dapat ditingkatkan lagi melebihi *yield* yang diperoleh dari eksperimen (Bezerra, dkk., 2008).



Gambar 4.11 Kontur Plot Optimasi Yield Etanol untuk *Mixed Culture*

Setelah dilakukan eksperimen untuk kondisi optimum fermentasi, diperoleh *yield* etanol sebesar 0.4066(g/g). Nilai ini lebih kecil dari *yield* prediktif yaitu 0.4269 (g/g). Hasil yang diperoleh memiliki persentase error 4.8%. Hal ini dikarenakan kurangnya keakuratan dalam melakukan eksperimen. Tetapi nilai *yield* yang diperoleh masih lebih tinggi dari keseluruhan nilai yang diperoleh masih lebih tinggi dari keseluruhan nilai *yield* 19 run ekseperimen sebelumnya.

IV.3 Perbandingan Efek Mikroorganisme Terhadap Kondisi Optimum Produksi Etanol

Dari hasil optimasi didapat perbandingan kondisi optimum fermentasi yang diringkas dalam tabel berikut:

Tabel 4.10 Perbandingan Kondisi Optimum

Mikroorganisme	pH	Konsentrasi Inokulum (sel/mL)	Konsentrasi Gula (g/L)	\hat{Y}	Y
<i>S.cerevisiae</i>	4.88	12,740,970	110	0.2368	0.2221
Miced Culture	5	7,251,454	110	0.4269	0.4066

Parameter pertama yang dibandingkan adalah pH. Dari hasil optimasi diperoleh bahwa pH optimum untuk *Saccharomyces cerevisiae* adalah 4.88 sedangkan untuk *Mixed culture* adalah 5. Terlihat bahwa pH optimum antara dua mikroorganisme tidak jauh berbeda. Menurut penelitian Lin, dkk (2012), untuk mendapatkan produksi etanol optimum dengan menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae*, rentang pH-nya adalah 4.0 - 5.0. Sementara menurut Agbobgo dan Kelly (20080, pH optimum untuk pertumbuhan *Pichia stipitis* terdapat pada rentang 4.5 - 5.5. Sehingga pH optimum yang didapat dari hasil optimasi sudah sesuai.

Parameter kedua yang dibandingkan adalah konsentrasi inokulum. *Saccharomyces cerevisiae* pada studi ini mencapai konsentrasi inokulum optimum pada 12,740,970 sel/mL, sedangkan *mixed culture* pada studi ini mencapai konsentrasi inokulum optimum pada 7,251,454 sel/mL. Dari data tersebut dapat dilihat bahwa *mixed culture* membutuhkan konsentrasi inokulum yang lebih sedikit dibandingkan dengan *Saccharomyces cerevisiae* untuk memproduksi etanol dengan kadar yang lebih tinggi. Hal ini dikarenakan pada *mixed culture* terdapat dua jenis mikroorganisme yang bekerjasama untuk memfermentasi gula menjadi etanol dalam substrat.

Parameter ketiga yang dibandingkan adalah konsentasi gula. Kadar gula optimum untuk *Saccharomyces cerevisiae* adalah 110 g/L dan kadar gula optimum untuk *Pichia stipitis* adalah 110 g/L. Menurut Agbogbo dan Kelly, *Saccharomyces cerevisiae* cenderung memproduksi etanol ketiga kadar gula rendah. Sedangkan *Pichia stipitis* menurut Rouhollah tahan terhadap kadar gula tinggi sehingga bisa memproduksi etanol dalam keadaan kadar gula tinggi.

Hasil optimasi menunjukkan fermentasi dengan *Saccharomyces cerevisie* menghasilkan *yield* 0.2368 (g/g) dan dengan *mixed culture* menghasilkan *yield* 0.4066 (g/g). Dapat dilihat bahwa hasil fermentasi menggunakan *mixed culture* lebih baik, karena gabungan antara *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipits* (a.k.a *Scheffersomyces stipitis*) membuat konversi dari heksosa menjadi lebih efektif yang berdampak pada peningkatan *yield* etanol (Adivikatla, dkk., 2012). Meskipun *Pichia stipitis* secara alami adalah untuk megurai gula pentosa (xylosa), namun *Pichia stipitis* memiliki tingkat konsumsi glukosa yang lebih tinggi dibandingkan xylosa pada kondisi fermentasi yang sama. Selain itu, *Pichia stipitis* juga lebih menyukai glukosa daripada xylosa (Agbogbo dan Kelly, 2008).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian dan analisa yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Variabel konsentrasi inokulum dan pH dalam desain eksperimen ini berpengaruh signifikan dalam proses produksi etanol menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan campuran mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*.
2. Dalam studi ini terdapat perbedaan kondisi optimal dalam fermentasi menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dimana kondisi optimal terjadi pada pH 4.77, konsentrasi gula 110 g/L, konsentrasi inokulum 12,740,970 sel/mL dan campuran mikroorganisme *Pichia stipitis* dan *Saccharomyces cerevisiae* dimana kondisi optimal terdapat pada pH 4.95, konsentrasi gula 110 g/L, konsentrasi inokulum 7.251.454 sel/mL.
3. Secara umum hasil fermentasi menggunakan campuran mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* lebih baik dan waktu fermentasi lebih cepat daripada menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae*.

V.2 Saran

1. Nira siwalan harus terhindar dari cahaya dan suhu panas serta segera dipasteurisasi, karena dapat terfermentasi secara alami.
2. Menggunakan model eksperimen dengan replikasi *run* untuk setiap variabel mikroorganisme.
3. Analisa DNS dan *counting chamber* hendaknya dilakukan dengan presisi tinggi guna menghindari *experimental error*.
4. Memperluas *range* konsentasi gula agar mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap model.

DAFTAR PUSTAKA

- Adivikatla V.R., Lanka S., Sridevi J., 2012, A Co-Culture Process with *Pichia stipitis* NCIM 3498 and Thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS3 for Ethanol Production using Acid Hydrolysate of Delignified Sorghum Straw, Process Biotechnology and Molecular Biology 6:84-90.
- Agbogbo F., Kelly G.C., Smith M.T., Wenger K.S., 2006, Fermentation of Glucose/Xylose Mixtures Using *Pichia stipitis*, Process Biochemistry 41:2333-2336.
- Agbogbo F., Kelly G.C., 2008, Cellulosic Ethanol Production Using the Naturally Occuring Xylose-Fermenting Yeast, *Pichia stipitis*, Biotechnology Letters 30:1515-1524.
- Arteaga G.E., Li-Chan E., Vasques-Arteaga M.C., Nakai S., 1994, Systematic Experimental Design for Product Formula Optimization, Trend Food Science Technology 5:243-254.
- Bai F.W., Anderson W.A., Moo-Young, 2008, Ethanol Fermentation Technologies from Sugar and Starch Feedstock, Bioethanol Advance 29:89-105.
- Barh, D., Mazumbar B.C., 2008, Comparative Nutritive Values of Palm Saps Before and After Their Partial Fermentation and Effective Use of Wild Date (*Phoenix sylvestris* Roxb.) Sap in Treatment of Anemia. Research Journal of Medicine and Science 3:173-176.
- Bezerra M.A., Santelli R.E., Oliveira E.P., Villar L.S., Escalreira L.A., 2008, Response Surface Methodology (RSM) as A Tool for Optimization in Analytical Chemistry, Talanta 76:965-977.

- Buzas Zs., Dallmann K., Szajani B., 1988, Influence of pH on the Growth and Ethanol Production of Free and Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells, *Biotechnology and Bioengineering* 34: 882-884.
- Chrisnasari R., Wardani A.K., Murdiyatmo U., 2011, Optimization of Ethanol Production from Palmyra Sap by *Zymomonas mobilis* Using Response Surface Methodology, *Microbiology Indonesia* 5:61-67.
- Du Preez J.C., 1986, Process Parameters and Environmental Factors Affecting D-Xylose Fermentation by Yeasts, *Enzyme Microb Technol* 16:944-956.
- Ferreira S., Duarte A.P., Ribeiro M.H.L., Queiroz J.A., Domingues F.C., 2009, Response Surface Optimization of Enzymatic Hydrolysis of *Citrus ladanifer* and *Cytisus striatus* for Bioethanol Production, *Biochemical Engineering Journal* 45:192-200.
- Grootjen J.F., van der Lans R.G.J.M., Luyben KChA, 1990, Effects of the Aeration Rate on The Fermentation of Glucose and Xylose by *Pichia stipitis* CBS 5773, *Enzyme Microbe Technol* 12:20-23.
- Humaidah N., Widjaja T., Budisetyowati N., Amirah H., 2017, Comparative Study of Microorganism Effect on The Optimization of Ethanol Production from Palmyra Sap (*Borassus flabellifer*) Using Response Surface Methodology, *Chemical Engineering Transaction* 56.
- Jayaseelan K., Seeveratnam S., 1986, Ethanol and Biomass from Palmyra Palm Sap, *Biotechnol Lett* 8:357-360.

- Kilian S.G., van Uden N., 1998, Transport of Xylose and Glucose in the Xylose Fermenting Yeast *Pichia stipitis*, Appl Microb Biotechnol 27:545-548.
- Kocher G.S., Uppal S., 2013, Fermentation Variables for the Fermentation of Glucose and Xylose Using *Saccharomyces cerevisiae* Y-2034 and *Pachysolan tannophilus* Y-2460, Indian Journal of Biotechnology 12:531-536.
- Kotter P., Ciriacy M., 1993, Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, Applied Microbiology and Biotechnology 38:776-778.
- Li C., Bai J., Cai Z., Ouwang F., 2002, Optimization of A Cultural Medium for Bacteriocin Production by *Lactococcus lactis* Using Response Surface Methodology, Journal of Biotechnology 93:27-34.
- Liu B.L., Tzeng Y.M., 1998, Optimization of Growth Medium for the Production of Spores from *Bacillus thuringiensis* Using Response Surface Methodology, Bioprocess Engineering 18:413-418.
- Montgomery Douglas C., Runger George C., 2002, Applied Statistics and Probability for Engineers, John Wiley and Sons, Inc., United States of America, 3rd.
- Prescott S.C., C.G. Dunn, 1981, Industrial Microbiology, Mc.Graw – Hill Book Co., Ltd., New York.
- Ratnam B.V.V., Rao S.S., Rao D.M., Rao N.M., Ayyanna C., 2005, Optimization of Medium Constituents and Fermentation Conditions for the Production of Ethanol from Palmyra Jaggery Using Response Surface Methodology, World J Microbiology Biotechnology 21:399-404.

- Ristriani S., Kuswardani I., Adikaryo M.I.L., 2001, Succession Pattern of Indegenous Microflora in Nira Siwalan Fermentation and Its Usage in Fermented Drink in Indonesia, *Biota* 4:1-8.
- S, Ghosh, R. Chakraborty, Raychaudhuri U., 2012, Optimizing Process Condition for Palm (*Borassus flabellifer*) Wine Fermentation Using Response Surface Methodology, *International Food Research Journal* 19(4):1633-1639.
- Widjaja T., Altway A., Ni'mah H., Tedji N., Rofiqah U., 2015, Technique of Ethanol Food Grade Production with Batch Distillation and Dehydration Using Starch-Based Adsorbent, *AIP Conf. Proc.* 1699, DOI: 10.1063/1.4938295.
- Widjaja T., Altway A., Nurkamidah S., Endahwati L., Lini F.Z., Oktafia F., 2016, The Effect of Pretreatment and Variety of Microorganism to the Production of Ethanol from Coffe Pulp, *ARPN Journal of Engineering and Applied Science* 11(2):1056-1060.

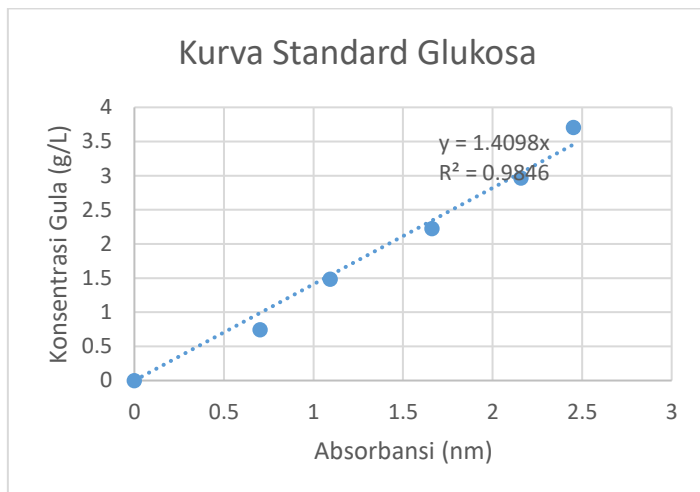
APPENDIKS

A. Kurva Standar Glukosa

Kurva standar glukosa dibuat dengan cara memplot konsentrasi glukosa dari larutan standar dengan absorbansi yang diperoleh dari pengukuran pada panjang gelombang 540 nm.

Tabel A.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Absorbansi (nm)	Konsentrasi Glukosa (g/L)
2.452	3.7060
2.159	2.948
1.6624	2.2236
1.0944	1.4824
0.7022	0.7412
0	0



Gambar A.1 Kurva Standar Glukosa

B. Perhitungan Konsentrasi Gula dalam Nira

Perhitungan konsentrasi gula dalam nira dilakukan dengan mengukur absorbansi sampel yang telah ditambahkan larutan DNS menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.

Dari hasil analisa konsentrasi gula dalam siwalan menggunakan metode DNS dengan pengenceran 100 kali, hasil pengamatan dari spektrofotometer adalah sebagai berikut:

$$A = 0.9899 \text{ nm}$$

Lalu A dimasukkan ke persamaan garis yang diperoleh dari kurva:

$$Y = 1.4098 \times X$$

$$= 1.4098 \times 0.9899$$

$$= 1.395698$$

Kemudian dikalikan faktor pengenceran 100 kali, sehingga didapatkan konsentrasi gula dalam broth = 139.5698 g/L.

B.1 Variabel *Saccharomyces cerevisiae*

Berikut adalah tabel penurunan kadar gula dalam nira siwalan selama proses fermentasi menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* berlangsung:

Tabel A.2 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 1 (pH: 4,5; Konsentrasi Inokulum: 8075000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 110 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		110
8	0.116	90.8535
16	1.018	79.7318
24	0.959	75.1108
32	0.361	28.2742
40	0.113	8.8504

48	0.097	7.5972
56	0.072	5.6392
64	0.051	3.9944
72	0.045	3.5245
80	0.027	2.1147

Tabel A.3 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 2 (pH: 6,5; Konsentrasi Inokulum: 8075000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 110 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		110
8	0.113	88.5038
16	0.871	63.7746
24	0.659	48.2519
32	0.525	38.4405
40	0.446	32.6561
48	0.261	19.1104
56	0.205	15.0101
64	0.096	7.0291
72	0.069	5.0521
80	0.061	4.4664

Tabel A.4 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 3 (pH: 4,5; Konsentrasi Inokulum: 11500000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 110 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		110
8	0.109	85.3710

16	1.072	83.96118
24	0.936	73.3094
32	0.845	66.1821
40	0.379	29.6840
48	0.118	9.2419
56	0.095	7.4405
64	0.057	4.4643
72	0.049	3.8378

Tabel A.5 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 4 (pH: 6,5;
Konsentrasi Inokulum: 11500000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 110
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		110
8	0.116	90.8535
16	0.914	71.5863
24	0.796	62.3443
32	0.581	45.5051
40	0.687	53.8072
48	0.504	39.4743
56	0.239	18.7190
64	0.094	7.3623
72	0.067	5.2476
80	0.063	4.9343

Tabel A.6 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 5 (pH: 4,5;
Konsentrasi Inokulum: 8075000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 130
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		130
8	0.162	126.8816
16	1.215	95.1612
24	1.108	86.7808
32	0.764	59.8380
40	0.24	18.7973
48	0.2	15.6644
56	0.083	6.5007
64	0.075	5.8742
72	0.051	3.9944
80	0.044	3.4462

Tabel A.7 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 6 (pH: 6,5;
Konsentrasi Inokulum: 8075000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 130
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		130
8	0.158	123.7488
16	1.117	87.4857
24	0.412	32.2687
32	0.171	13.3931
40	0.114	8.9287
48	0.099	7.7539
56	0.087	6.8140

64	0.071	5.5609
72	0.045	3.5245

Tabel A.8 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 7 (pH: 4,5; Konsentrasi Inokulum: 11500000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 130 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		130
8	0.142	111.2172
16	1.304	102.1319
24	1.18	92.4200
32	1.084	84.9010
40	0.634	49.6561
48	0.456	35.7148
56	0.333	26.0812
64	0.186	14.5679
72	0.172	13.4714
80	0.048	3.7595

Tabel A.9 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 8 (pH: 6,5; Konsentrasi Inokulum: 11500000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 130 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		130
8	0.132	103.3850
16	1.006	78.7919
24	0.843	66.0254
32	0.669	52.3974

40	0.372	29.1358
48	0.319	24.9847
56	0.118	9.2420
64	0.11	8.6154
72	0.104	8.1455
80	0.095	7.4406

Tabel A.10 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 9 (pH: 3.77; Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		120
8	0.122	95.5528
16	1.005	78.7136
24	0.637	49.8911
32	0.411	32.1903
40	0.148	11.5917
48	0.102	7.9888
56	0.038	2.9762
64	0.019	1.4881

Tabel A.11 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 10 (pH: 7.23; Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		115
8	0.119	93.2032
16	0.793	62.1093

24	0.787	61.6394
32	0.419	32.8169
40	0.371	29.0575
48	0.279	21.8518
56	0.186	14.5679
64	0.162	12.6882
72	0.149	11.6700
80	0.07	5.4825

Tabel A.12 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 11 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 6821363 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		115
8	0.106	83.0213
16	0.998	78.1654
24	0.448	35.0883
32	0.125	9.7903
40	0.089	6.9707
48	0.061	4.7776
56	0.056	4.3860
64	0.037	2.8979
72	0.026	2.0364

Tabel A.13 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 12 (pH: 5,5;
Konsentrasi Inokulum: 12753637 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		115
8	0.109	85.3710
16	0.802	62.8142
24	0.704	55.1387
32	0.526	41.1974
40	0.132	10.3385
48	0.104	8.1455
56	0.069	5.4042
64	0.059	4.6210
72	0.035	2.7413

Tabel A.14 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 13 (pH: 5,5;
Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula:
102.68 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		102.68
8	0.113	88.5039
16	0.65	50.9093
24	0.611	47.8547
32	0.226	17.7008
40	0.128	10.0252
48	0.08	6.2658
56	0.054	4.2294
64	0.031	2.4280

72	0.008	0.6266
----	-------	--------

Tabel A.15 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 14 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 137.32 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		137.32
8	0.128	100.2522
16	0.831	65.0856
24	0.411	32.1903
32	0.197	15.4294
40	0.136	10.6518
48	0.1	7.8322
56	0.08	6.2658
64	0.07	5.4825
72	0.062	4.8560
80	0.024	1.8797

Tabel A.16 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 15 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		120
8	1.4993	117.4282
16	0.846	66.2604
24	0.446	34.9316
32	0.18	14.0980
40	0.161	12.6098

48	0.086	6.7357
56	0.03	2.3497
64	0.016	1.2532
72	0.007	0.5483
80	0.001	0.0783

Tabel A.17 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 16 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		120
8	1.22	95.5528
16	0.878	68.7667
24	0.459	35.9498
32	0.371	29.0575
40	0.293	22.9483
48	0.18	14.0980
56	0.154	12.0616
64	0.056	4.3860
72	0.05	3.9161
80	0.008	0.6266

Tabel A.18 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 17 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		120
8	1.358	106.3613
16	0.86	67.3569
24	0.469	36.7330
32	0.255	19.9721
40	0.181	14.1763
48	0.158	12.3749
56	0.091	7.1273
64	0.067	5.2476
72	0.019	1.4881
80	0.003	0.2350

Tabel A.19 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 18 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		120
8	1.462	114.5068
16	0.882	69.0800
24	0.565	44.2519
32	0.402	31.4854
40	0.398	31.1722
48	0.368	28.8225
56	0.2	15.6644

64	0.105	8.2238
72	0.024	1.8797
80	0.004	0.3133

Tabel A.20 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 19 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		120
8	1.373	1075.3611
16	0.838	65.6338
24	0.502	39.3176
32	0.362	28.3526
40	0.256	20.0504
48	0.23	18.0141
56	0.082	6.4224
64	0.051	3.9944
72	0.026	2.0364
80	0.007	0.5483

B.2 Variabel *Mixed Culture Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*

Berikut adalah tabel penurunan kadar gula dalam nira siwalan selama proses fermentasi menggunakan kombinasi mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* berlangsung:

Tabel A.21 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 1 (pH: 4,5; Konsentrasi Inokulum: 6400000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 110 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		110
8	1.039	81.3766
16	0.591	46.2883
24	0.188	14.7245
32	0.066	5.1693
40	0.051	3.9944
48	0.029	2.2713

Tabel A.22 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 2 (pH: 6,5; Konsentrasi Inokulum: 6400000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 110 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		110
8	1.055	82.6297
16	0.299	23.4183
24	0.055	4.3077
32	0.047	3.6811
40	0.034	2.6629
48	0.031	2.4280

Tabel A.23 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 3 (pH: 4,5;
Konsentrasi Inokulum: 7025000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 110
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		110
8	0.963	75.4241
16	0.616	48.2464
24	0.229	17.9357
32	0.094	7.3623
40	0.038	2.9762
48	0.028	2.1930

Tabel A.24 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 4 (pH: 6,5;
Konsentrasi Inokulum: 7025000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 110
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		110
8	0.946	74.0926
16	0.576	45.1135
24	0.15	11.7483
32	0.108	8.4588
40	0.072	5.6392
48	0.051	3.9944

Tabel A.25 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 5 (pH: 4,5;
Konsentrasi Inokulum: 6400000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 130
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		130
8	1.52	119.0494
16	0.772	60.4646
24	0.312	24.4365
32	0.084	6.5790
40	0.082	6.4224
48	0.041	3.2112

Tabel A.26 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 6 (pH: 6,5;
Konsentrasi Inokulum: 6400000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 130
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		130
8	1.225	95.9445
16	0.678	53.1023
24	0.116	9.0854
32	0.087	6.8140
40	0.076	5.9525
48	0.032	2.5063

Tabel A.27 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 7 (pH: 4,5;
Konsentrasi Inokulum: 7025000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 130
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		130
8	1.258	98.5291
16	0.622	48.7163
24	0.352	27.5693
32	0.136	10.6518
40	0.063	4.9343
48	0.037	2.8979

Tabel A.28 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 8 (pH: 6,5;
Konsentrasi Inokulum: 7025000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 130
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		130
8	1.228	96.1794
16	0.811	63.5191
24	0.169	13.2364
32	0.092	7.2056
40	0.06	4.6993
48	0.052	4.0727

Tabel A.29 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 9 (pH: 3,77;
Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		120
8	1.43	112.0005
16	0.722	56.5485
24	0.192	15.0378
32	0.044	3.4462
40	0.039	3.0546
48	0.01	0.7832

Tabel A.30 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 10 (pH: 7,23;
Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		120
8	1.214	95.0829
16	0.189	14.8029
24	0.08	6.2658
32	0.057	4.4644
40	0.052	4.0727
48	0.032	2.5063

Tabel A.31 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 11 (pH: 5,5;
Konsentrasi Inokulum: 6171234 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		120
8	1.458	114.1935
16	0.216	16.9176
24	0.067	5.2476
32	0.066	5.1693
40	0.064	5.0126
48	0.051	3.9944

Tabel A.32 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 12 (pH: 5,5;
Konsentrasi Inokulum: 7253766 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		120
8	1.444	113.0970
16	0.547	42.8421
24	0.151	11.8266
32	0.098	7.6756
40	0.068	5.3259
48	0.034	2.6629

Tabel A.33 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 13 (pH: 5,5;
Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula:
102,68 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		102.68
8	1.154	90.3836
16	0.1	7.8322
24	0.068	5.3259
32	0.025	1.9581
40	0.024	1.8797
48	0.021	1.6448

Tabel A.34 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 14 (pH: 5,5;
Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula:
137,32 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		137.32
8	1.545	121.0075
16	1.26	98.6857
24	0.443	34.6966
32	0.099	7.7539
40	0.088	6.8923
48	0.062	4.8560

Tabel A.35 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 15 (pH: 5,5;
Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		120
8	1.315	102.9934
16	0.698	54.6688
24	0.265	20.7553
32	0.069	5.4042
40	0.055	4.3077
48	0.03	2.3497

Tabel A.36 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 16 (pH: 5,5;
Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		120
8	1.372	107.4578
16	0.666	52.1625
24	0.197	15.4294
32	0.105	8.2238
40	0.058	4.5427
48	0.04	3.1329

Tabel A.37 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 17 (pH: 5,5;
Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		120
8	1.346	105.4214
16	0.74	57.9583
24	0.149	11.6700
32	0.099	7.7539
40	0.061	4.7776
48	0.034	2.6629

Tabel A.38 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 18 (pH: 5,5;
Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		120
8	1.266	99.1557
16	0.174	13.6280
24	0.108	8.4588
32	0.063	4.9343
40	0.047	3.6811
48	0.034	2.6629

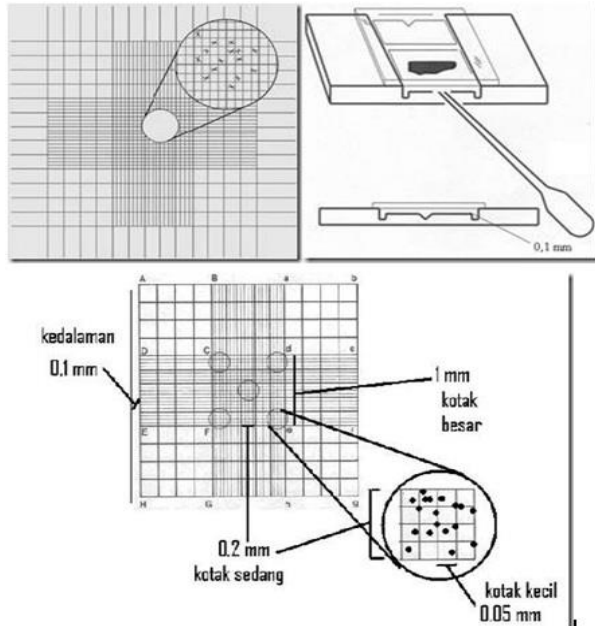
Tabel A.39 Perhitungan Kadar Gula Reduksi Run 19 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Kadar Gula (g/L)
0		115
8	1.432	112.1571
16	0.431	33.7568
24	0.075	5.8742
32	0.068	5.3259
40	0.049	3.8378
48	0.032	2.5063

C. Perhitungan Jumlah Sel

Jumlah sel dihitung dengan metode *counting chamber* menggunakan *Haemocytometer*. Perhitungan jumlah sel pada saat pembuatan starter penting dilakukan untuk mengetahui fase log mikroorganisme sehingga proses fermentasi berjalan dengan baik karena mikroorganisme tumbuh dengan baik. Perhitungan sel juga dilakukan selama proses fermentasi untuk mengetahui adanya pengaruh mikroorganisme selama proses fermentasi.

Dalam analisa *counting chamber* dipergunakan 16 kotak paling kecil yang memiliki luas 0,0025 mm². Lalu ditentukan 5 kotak yang akan dihitung jumlah selnya.



Gambar A.2 Detail dari *Haemacytometer Neubauer*

A			B
	E		
C			D

Gambar A.3 Pemilihan Kotak pada *Haemacytometer*

Data:

Faktor pengenceran = 10 kali

Sisi kotak kecil = 0,05 mm

Tebal hemasitometer = 0,1 mm

Contoh perhitungan:

$$\text{Jumlah sel} = 8 \frac{\text{sel}}{\text{kotak}} \times 25 \frac{\text{kotak}}{\text{mm}^2} \times 10 \frac{\text{mm}^2}{\text{mm}^3} \times 1000 \frac{\text{mm}^3}{\text{mL sampel}}$$

$$= 2.000.000 \text{ sel/mL sampel}$$

C.1 Variabel *Saccharomyces cerevisiae*

Berikut adalah hasil perhitungan jumlah sel *Saccharomyces cerevisiae* dalam pembuatan *starter* dan selama proses fermentasi:

Tabel A.40 Pehitungan Jumlah Sel untuk Kurva Pertumbuhan
Saccharomyces cerevisiae

Jam ke-	A	B	C	D	E	Rata-rata	sel/mL sampel
1	17.5	20	23.5	18.5	22.5	20.4	5100000
2	20.5	25	25	21	24	23.1	5775000
3	18.5	25	23.5	19	23	21.8	5450000
4	18	29	26	32.5	36	28.3	7075000
5	25	34	33	32	37.5	32.3	8075000
6	39.5	54	33.5	37	34	39.6	9900000
7	47.5	56.5	40	41	45	46	11500000
8	50	49.5	40	51	62.5	50.6	12650000
9	45	46.5	45	39	49.5	45	11250000
10	40.5	45	51	43.5	40.5	44.1	11025000
11	38	44	39.5	61	40.5	44.6	11150000
12	31.5	34	36.5	43.5	50.5	39.2	9800000
13	30	30.5	34	35	39.5	33.8	8450000

14	30.5	35.5	28.5	26	27.5	29.6	7400000
15	21	25	21	31	31.5	25.9	6475000

Tabel A.41 Perhitungan Jumlah Sel Run 1 (pH: 4,5; Konsentrasi Inokulum: 8075000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 110 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	30	35	37	41	30	8650000
8	45	45	53	50	53	12300000
16	30	53	52	42	30	10350000
24	48	58	56	50	55	13350000
32	110	185	145	110	135	34250000
40	124	150	160	183	136	37650000
48	54	95	78	125	116	23400000
56	51	75	55	68	79	16400000
64	55	60	96	94	85	19500000
72	29	64	56	82	75	15300000
80	40	41	42	41	59	11150000

Tabel A.42 Perhitungan Jumlah Sel Run 2 (pH: 6,5; Konsentrasi Inokulum: 8075000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 110 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	33	30	42	41	45	9550000
8	42	40	52	54	43	11550000
16	32	34	51	45	31	9650000
24	80	65	110	100	80	21750000
32	135	140	115	132	150	33600000

40	107	113	125	134	145	31200000
48	115	137	128	120	80	29000000
56	69	96	130	80	75	22500000
64	56	65	52	78	38	14450000
72	35	60	75	56	45	13550000
80	31	47	43	46	42	10450000

Tabel A.43 Perhitungan Jumlah Sel Run 3 (pH: 4,5; Konsentrasi Inokulum: 11500000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 110 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	40	45	55	42	43	11250000
8	40	48	52	52	35	11350000
16	43	54	50	50	36	11650000
24	60	65	70	85	90	18500000
32	90	101	98	120	85	24700000
40	100	110	117	135	123	29250000
48	85	116	108	105	116	26500000
56	86	100	98	121	110	25750000
64	65	58	103	76	79	19050000
72	58	59	71	73	72	16650000

Tabel A.44 Perhitungan Jumlah Sel Run 4 (pH: 6,5; Konsentrasi Inokulum: 11500000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 110 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	44	32	52	49	48	11250000
8	43	42	50	57	49	12050000

16	44	45	42	48	51	11500000
24	70	75	80	65	66	17800000
32	100	120	110	90	95	25750000
40	111	121	135	123	116	30300000
48	95	132	134	100	111	28600000
56	85	99	103	105	95	24350000
64	41	59	68	74	35	13850000
72	43	41	56	63	35	11900000
80	40	45	36	49	55	11250000

Tabel A.45 Perhitungan Jumlah Sel Run 5 (pH: 4,5; Konsentrasi Inokulum: 8075000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 130 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	35	37	39	30	25	8300000
8	40	29	35	43	49	9800000
16	46	48	51	50	39	11700000
24	45	65	66	70	70	15800000
32	83	121	131	101	109	27250000
40	116	132	141	145	133	33350000
48	119	133	136	135	103	31300000
56	103	135	128	136	100	30100000
64	63	46	31	44	54	11900000
72	39	44	36	54	61	11700000
80	54	43	30	44	53	11200000

Tabel A.46 Perhitungan Jumlah Sel Run 6 (pH: 6,5; Konsentrasi Inokulum: 8075000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 130 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	30	33	35	37	33	8400000
8	43	40	45	35	49	10600000
16	48	49	38	52	51	11900000
24	66	65	70	100	80	19050000
32	100	133	115	123	119	29500000
40	123	140	116	125	131	31750000
48	125	89	134	107	105	28000000
56	42	53	65	46	58	13200000
64	41	46	57	48	54	12300000
72	39	48	51	41	42	11050000

Tabel A.47 Perhitungan Jumlah Sel Run 7 (pH: 4,5; Konsentrasi Inokulum: 11500000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 130 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	42	41	43	47	51	11200000
8	25	39	41	28	45	8900000
16	51	52	39	40	42	11200000
24	65	70	71	90	75	18550000
32	100	95	100	98	130	26150000
40	121	103	106	111	134	28750000
48	119	100	88	103	136	27300000
56	121	96	85	75	89	23300000
64	65	64	54	52	45	14000000

72	58	52	43	41	36	11500000
80	36	40	36	40	30	9100000

Tabel A.48 Perhitungan Jumlah Sel Run 8 (pH: 6,5; Konsentrasi Inokulum: 11500000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 130 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	41	40	44	45	51	11050000
8	38	40	42	43	41	10200000
16	53	51	50	39	45	11900000
24	72	75	68	95	68	18900000
32	135	100	141	147	110	31650000
40	100	111	146	150	112	30950000
48	118	113	130	137	101	29950000
56	78	93	99	100	104	23700000
64	67	68	73	53	49	15500000
72	53	67	68	56	46	14500000
80	50	61	63	50	41	13250000

Tabel A.49 Perhitungan Jumlah Sel Run 9 (pH: 3,77; Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	38	45	35	37	40	9750000
8	29	26	42	42	39	8900000
16	47	43	33	53	50	11300000
24	69	73	69	110	63	19200000
32	110	115	124	103	89	27050000

40	52	61	65	49	52	13950000
48	50	60	61	49	52	13600000
56	44	45	29	35	42	9750000
64	24	23	25	31	34	6850000

Tabel A.50 Perhitungan Jumlah Sel Run 10 (pH: 7,23;
Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120
g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	41	36	40	37	39	9650000
8	31	35	34	44	39	9150000
16	48	40	41	56	43	11400000
24	60	58	70	105	100	19650000
32	110	105	145	100	85	27250000
40	117	108	148	113	115	30050000
48	116	107	144	112	113	29600000
56	120	110	120	95	96	27050000
64	48	45	56	53	68	13500000
72	28	37	38	46	49	9900000
80	15	39	36	49	52	9550000

Tabel A.51 Perhitungan Jumlah Sel Run 11 (pH: 5,5; Konsentrasi
Inokulum: 6821363 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	30	15	29	26	24	6200000
8	29	37	43	42	41	9600000

16	60	66	54	69	50	14950000
24	63	68	75	72	105	19150000
32	117	95	85	105	125	26350000
40	118	106	103	116	133	28800000
48	117	105	103	114	135	28700000
56	52	57	55	65	62	14550000
64	50	56	54	63	61	14200000
72	38	36	53	47	41	10750000

Tabel A.52 Perhitungan Jumlah Sel Run 12 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 12753637 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	42	59	56	43	49	12450000
8	49	41	42	45	50	11350000
16	120	130	110	136	137	31650000
24	100	135	136	137	140	32400000
32	150	145	136	145	155	36550000
40	150	143	145	150	156	37200000
48	144	130	131	140	133	33900000
56	69	72	47	49	52	14450000
64	43	46	49	65	39	12100000
72	40	42	45	30	41	9900000

Tabel A.53 Perhitungan Jumlah Sel Run 13 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 102,68 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	34	42	37	40	39	9600000
8	25	27	38	47	41	8900000
16	60	64	43	45	50	13100000
24	65	68	75	70	64	17100000
32	85	95	113	115	129	26850000
40	100	105	125	117	131	28900000
48	100	106	131	100	120	27850000
56	16	19	27	29	36	6350000
64	15	18	25	28	33	5950000
72	13	17	23	31	26	5500000

Tabel A.54 Perhitungan Jumlah Sel Run 14 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 137,32 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	37	39	34	39	41	9500000
8	50	41	42	42	43	10900000
16	70	65	56	66	70	16350000
24	72	74	75	70	68	17950000
32	116	120	135	100	110	29050000
40	117	120	136	106	105	29200000
48	113	114	133	105	103	28400000
56	35	47	49	53	57	12050000
64	35	46	48	52	51	11600000

72	34	41	43	30	31	8950000
80	23	37	35	26	34	7750000

Tabel A.55 Perhitungan Jumlah Sel Run 15 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	37	38	41	35	39	9500000
8	30	40	41	43	35	9450000
16	56	55	50	49	51	13050000
24	72	65	78	80	64	17950000
32	120	113	95	100	132	28000000
40	126	116	107	118	133	30000000
48	114	116	103	102	121	27800000
56	28	29	35	46	35	8650000
64	29	28	37	36	35	8250000
72	36	29	31	33	32	8050000
80	32	33	35	34	32	8300000

Tabel A.56 Perhitungan Jumlah Sel Run 16 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	36	41	34	45	39	9750000
8	40	40	42	40	36	9900000
16	48	53	58	52	55	13300000
24	59	66	68	64	75	16600000
32	90	110	131	121	118	28500000

40	100	121	130	116	119	29300000
48	93	134	135	111	95	28400000
56	85	126	124	91	82	25400000
64	29	35	34	37	40	8750000
72	20	36	31	34	37	7900000
80	18	34	30	34	35	7550000

Tabel A.57 Perhitungan Jumlah Sel Run 17 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	37	39	42	36	35	9450000
8	43	35	35	30	48	9550000
16	47	62	51	53	49	13100000
24	50	58	78	79	69	16700000
32	92	116	130	128	100	28300000
40	107	119	130	129	108	29650000
48	106	117	138	125	99	29250000
56	100	91	108	97	79	23750000
64	56	45	49	36	39	11250000
72	41	42	35	34	41	9650000
80	26	31	23	29	33	7100000

Tabel A.58 Perhitungan Jumlah Sel Run 18 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	36	39	37	41	35	9400000

8	48	41	30	36	38	9650000
16	45	65	51	50	52	13150000
24	54	59	68	70	100	17550000
32	100	98	115	107	116	26800000
40	85	101	110	106	115	25850000
48	36	111	113	121	98	23950000
56	39	49	56	55	49	12400000
64	31	40	38	27	30	8300000
72	32	31	24	28	25	7000000
80	26	30	27	29	29	7050000

Tabel A.59 Perhitungan Jumlah Sel Run 19 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 9787500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	39	34	34	43	37	9350000
8	45	42	41	32	39	9950000
16	49	53	54	52	60	13400000
24	67	78	79	80	75	18950000
32	116	89	113	100	112	26500000
40	84	120	103	105	150	28100000
48	113	103	96	102	127	27050000
56	106	93	81	75	106	23050000
64	44	45	56	39	43	11350000
72	37	42	52	39	40	10500000
80	21	33	45	37	41	8850000

C.2 Variabel *Mixed Culture Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*

Berikut adalah hasil perhitungan jumlah sel *mixed culture Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* dalam pembuatan *starter* dan selama proses fermentasi:

Tabel A.60 Pehitungan Jumlah Sel untuk Kurva Pertumbuhan *Mixed Culture Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*

Jam ke-	A	B	C	D	E	Rata-rata	sel/mL sampel
1	13.5	21	16	20	18.5	17.8	4450000
2	16.5	13	15	19	23.5	17.4	4350000
3	22	17.5	19	20	24.5	20.6	5150000
4	23	17	31.5	16.5	27	23	5750000
5	26	18.5	27	29	27.5	25.6	6400000
6	22	27.5	33	27	23.5	26.6	6650000
7	20	24.5	29.5	34.5	32	28.1	7025000
8	27	24.5	31	28.5	37.5	29.7	7425000
9	25	24.5	23.5	29	32	26.8	6700000
10	23	18.5	26.5	27	30	25	6250000
11	23.5	22	24.5	18.5	19.5	21.6	5400000
12	21.5	19	24	21.5	25.5	22.3	5575000
13	23.5	20.5	22	18	18.5	20.5	5125000
14	17	24	21	19	20.5	20.3	5075000
15	16.5	19.5	16.5	18.5	19.5	18.1	4525000

Tabel A.61 Perhitungan Jumlah Sel Run 1 (pH: 4,5; Konsentrasi Inokulum: 6400000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 110 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	21	26	27	31	24	6450000
8	60	55	43	49	65	13600000
16	49	39	45	60	54	12350000
24	37	63	99	75	61	16750000
32	80	86	101	103	39	20450000
40	51	113	95	125	100	24200000
48	58	62	95	76	92	19150000

Tabel A.62 Perhitungan Jumlah Sel Run 2 (pH: 6,5; Konsentrasi Inokulum: 6400000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 110 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	23	33	21	22	27	6300000
8	42	40	55	15	26	8900000
16	44	56	53	23	32	10400000
24	55	67	75	69	56	16100000
32	81	85	98	105	80	22450000
40	121	106	113	108	96	27200000
48	60	87	92	73	86	19900000

Tabel A.63 Perhitungan Jumlah Sel Run 3 (pH: 4,5; Konsentrasi Inokulum: 7025000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 110 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	35	27	22	23	33	7000000
8	42	37	41	43	57	11000000
16	46	41	38	40	57	11100000
24	92	96	75	94	86	22150000
32	120	130	85	98	111	27200000
40	108	132	167	97	107	30550000
48	79	86	91	65	99	21000000

Tabel A.64 Perhitungan Jumlah Sel Run 4 (pH: 6,5; Konsentrasi Inokulum: 7025000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 110 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	25	24	31	26	35	7050000
8	55	43	51	27	36	10600000
16	56	45	39	56	38	11700000
24	87	96	78	85	83	21450000
32	120	130	85	98	111	27200000
40	124	131	106	123	115	29950000
48	71	86	99	85	105	22300000

Tabel A.65 Perhitungan Jumlah Sel Run 5 (pH: 4,5; Konsentrasi Inokulum: 6400000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 130 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	24	21	25	30	22	6100000
8	29	25	32	24	31	7050000
16	57	70	56	12	50	12250000
24	80	46	60	50	61	14850000
32	125	85	96	109	99	25700000
40	130	108	118	120	113	29450000
48	90	98	96	81	94	22950000

Tabel A.66 Perhitungan Jumlah Sel Run 6 (pH: 6,5; Konsentrasi Inokulum: 6400000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 130 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	33	26	24	26	19	6400000
8	27	24	27	25	33	6800000
16	58	72	115	85	55	19250000
24	63	72	117	70	70	19600000
32	85	136	131	150	100	30100000
40	169	109	100	150	132	33000000
48	88	105	78	86	93	22500000

Tabel A.67 Perhitungan Jumlah Sel Run 7 (pH: 4,5; Konsentrasi Inokulum: 7025000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 130 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	24	21	50	35	10	7000000
8	28	25	49	30	15	7350000
16	45	43	52	39	28	10350000
24	42	35	37	55	60	11450000
32	88	98	116	133	96	26550000
40	104	86	140	136	141	30350000
48	79	84	95	98	85	22050000

Tabel A.68 Perhitungan Jumlah Sel Run 8 (pH: 6,5; Konsentrasi Inokulum: 7025000 sel/mL; Konsentrasi Gula: 130 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	20	22	37	35	31	7250000
8	28	22	35	21	41	7350000
16	33	41	34	34	50	9600000
24	63	116	119	108	81	24350000
32	87	95	103	150	121	27800000
40	116	125	115	126	130	30600000
48	101	94	115	87	94	24550000

Tabel A.69 Perhitungan Jumlah Sel Run 9 (pH: 3,77; Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	26	25	30	21	32	6700000
8	60	61	55	50	64	14500000
16	68	65	60	58	66	15850000
24	70	46	95	77	68	17800000
32	136	108	109	110	99	28100000
40	120	138	141	100	125	31200000
48	100	93	95	116	98	25100000

Tabel A.70 Perhitungan Jumlah Sel Run 10 (pH: 7,23; Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	29	30	26	19	29	6650000
8	46	48	63	36	44	11850000
16	56	54	72	51	53	14300000
24	61	70	73	78	69	17550000
32	150	107	130	133	113	31650000
40	140	106	125	131	109	30550000
48	110	103	112	111	80	25800000

Tabel A.71 Perhitungan Jumlah Sel Run 11 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 6171234 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	26	30	27	21	26	6500000
8	42	43	38	46	30	9950000
16	53	48	44	61	60	13300000
24	74	72	88	90	71	19750000
32	119	131	128	121	128	31350000
40	99	128	120	150	143	32000000
48	93	104	120	95	102	25700000

Tabel A.72 Perhitungan Jumlah Sel Run 12 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 7253766 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	28	23	22	34	38	7250000
8	39	48	41	31	42	10050000
16	60	51	52	56	55	13700000
24	73	69	83	72	70	18350000
32	123	132	139	128	119	32050000
40	121	144	139	136	133	33650000
48	123	125	101	91	94	26700000

Tabel A.73 Perhitungan Jumlah Sel Run 13 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 102,68 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	12	14	18	54	31	6450000
8	31	47	42	60	32	10600000
16	49	56	57	72	49	14150000
24	78	69	72	71	65	17750000
32	139	144	128	120	137	33400000
40	142	135	139	145	137	34900000
48	109	87	93	99	108	24800000

Tabel A.74 Perhitungan Jumlah Sel Run 14 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 137,32 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	23	24	26	32	29	6700000
8	44	34	37	39	42	9800000
16	47	38	60	56	58	12950000
24	67	69	80	73	72	18050000
32	122	146	129	136	145	33900000
40	152	141	130	128	140	34550000
48	130	109	99	107	121	28300000

Tabel A.75 Perhitungan Jumlah Sel Run 15 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	27	31	25	24	25	6600000
8	4	12	26	21	11	3700000
16	52	85	65	85	83	18500000
24	108	68	57	69	90	19600000
32	118	116	133	129	108	30200000
40	101	120	140	103	115	28950000
48	103	99	88	77	94	23050000

Tabel A.76 Perhitungan Jumlah Sel Run 16 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	60	10	19	12	35	6800000
8	40	32	37	16	27	7600000
16	54	34	23	55	43	10450000
24	60	67	92	110	112	22050000
32	130	94	113	121	117	28750000
40	150	125	131	121	105	31600000
48	97	83	101	94	92	23350000

Tabel A.77 Perhitungan Jumlah Sel Run 17 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	28	19	28	34	25	6700000
8	74	37	70	22	30	11650000
16	81	53	76	39	42	14550000
24	79	63	74	59	69	17200000
32	148	128	121	150	108	32750000
40	158	161	123	172	170	39200000
48	128	130	95	110	137	30000000

Tabel A.78 Perhitungan Jumlah Sel Run 18 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	42	16	24	25	27	6700000
8	47	38	32	52	41	10500000
16	48	49	38	59	56	12500000
24	63	62	73	76	61	16750000
32	148	116	125	128	122	31950000
40	130	110	160	130	101	31550000
48	113	108	106	131	128	29300000

Tabel A.79 Perhitungan Jumlah Sel Run 19 (pH: 5,5; Konsentrasi Inokulum: 6712500 sel/mL; Konsentrasi Gula: 120 g/L)

Waktu Fermentasi (Jam)	A	B	C	D	E	Konsentrasi Inokulum (sel/ml sampel)
0	22	24	30	28	29	6650000
8	38	42	53	33	40	10300000
16	49	54	63	51	58	13750000
24	69	73	78	64	68	17600000
32	159	138	163	128	136	36200000
40	128	127	153	162	143	35650000
48	128	121	133	126	125	31650000

D. Perhitungan Yield

Analisa kandungan etanol dalam *broth* dilakukan dengan metode Gas Chromatography. Kondisi GC yang digunakan adalah:

Model : Thermo Scientific Trace GC Ultra

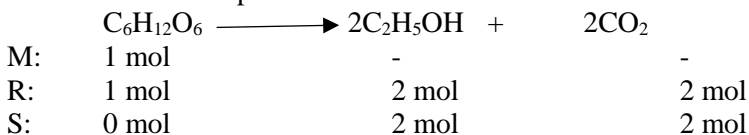
Detector : FID & TCD

Coloumn : Capillary Coloumn HP 19095P-Q04

Menghitung Yield Teoritis

Basis : 1 mol glukosa

Asumsi: reaksi sempurna



$$\begin{aligned}
 \text{Yiled} &= \frac{\text{massa produk}}{\text{massa reaktan masuk reaktor}} \\
 &= \frac{2 \text{ mol EtOH}}{1 \text{ mol glukosa}} \\
 &= \frac{46 \text{ gr/mol}}{180 \text{ gr/mol}} \\
 &= 0.51
 \end{aligned}$$

Menghitung Kadar Etanol, Yield Fermentasi, dan % Yield

Data Penelitian:

$$\begin{aligned}\text{Volume kerja} &= 100 \text{ mL} = 0.1 \text{ L} \\ \text{Kadar glukosa awal} &= 110 \text{ g/L} \\ \text{Hasil Fermentasi} &= 1.8961\% \text{ (v/v)} \\ \text{Volume etanol} &= 1.8961 \text{ mL} \\ &= 0.0018961 \text{ L}\end{aligned}$$

Perhitungan:

$$\begin{aligned}\text{Massa glukosa awal} &= 110 \text{ g/L} \times 0.1 \text{ L} \\ &= 11 \text{ g} \\ \text{Massa Etanol} &= \text{Volume etanol} \times \rho \text{ etanol} \\ &= 0.00189 \text{ L} \times 789 \text{ g/L} \\ &= 1.4959 \text{ g}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Yield Fermentasi} &= \frac{\text{Massa etanol terbentuk}}{\text{Massa Gula Awal}} \\ &= \frac{1.496 \text{ g EtOH}}{11 \text{ g glukosa}} \\ &= 0.136 \text{ (g/g)}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\% \text{ Yield} &= \frac{\text{Yield Fermentasi}}{\text{Yield Teoritis}} \\ &= \frac{0.136}{0.51} \times 100\% \\ &= 26.67\%\end{aligned}$$

Tabel A.80 Hasil Kadar Etanol dan Perhitungan Yield untuk Variabel Mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae*

Run ke-	Kadar etanol (% v/v)	Massa etanol (g)	Yield (g/g)	% Yield
1	1.8961	1.4960	0.1360	0.2667
2	1.0624	0.8382	0.0762	0.1494
3	2.9602	2.3356	0.2123	0.4163
4	1.9515	1.5397	0.1400	0.2745

5	3.1881	2.5154	0.1935	0.3794
6	2.2044	1.7393	0.1338	0.2623
7	2.9328	2.3140	0.1780	0.3490
8	2.0101	1.5860	0.1220	0.2392
9	1.5195	1.1989	0.0999	0.1959
10	0.8897	0.7020	0.0585	0.1147
11	1.6202	1.2783	0.1065	0.2089
12	2.7710	2.1863	0.1822	0.3572
13	2.3634	1.8647	0.1816	0.3560
14	3.1219	2.4632	0.1794	0.3518
15	1.8963	1.4962	0.1247	0.2445
16	2.0101	1.5860	0.1322	0.2591
17	2.0259	1.5984	0.1332	0.2612
18	2.9583	2.3341	0.1945	0.3814
19	2.3717	1.8713	0.1559	0.3058

Tabel A.81 Hasil Kadar Etanol dan Perhitungan Yield untuk Variabel Mikroorganisme *Mixed Culture Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*

Run ke-	Kadar etanol (% v/v)	Massa etanol (g)	Yield (g/g)	% Yield
1	3.6700	2.8956	0.2636	0.5169
2	2.2000	1.7358	0.1579	0.3096
3	4.7300	3.7320	0.3394	0.6655
4	3.9500	3.1166	0.2833	0.5555
5	4.2500	3.3533	0.2577	0.5053
6	3.6300	2.8641	0.2209	0.4331
7	5.9800	4.7182	0.3632	0.7122
8	3.6400	2.8720	0.2397	0.4700

9	2.1600	1.7042	0.1420	0.2784
10	1.2700	1.0020	0.0835	0.1637
11	0.7500	0.5918	0.0493	0.0967
12	5.4500	4.3001	0.3583	0.7025
13	5.0700	4.0002	0.3898	0.7643
14	5.9100	4.6630	0.3995	0.7833
15	3.1100	2.4538	0.2045	0.4010
16	3.2600	2.5721	0.2144	0.4204
17	3.4500	2.7221	0.2269	0.4449
18	2.7200	2.1461	0.1791	0.3512
19	2.3900	1.8857	0.1571	0.3080

E. Optimasi

E.1 Program MINITAB® untuk Variabel Mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae*

Response Surface Regression: Yield versus pH, C Inokulum, C Gula

The analysis was done using coded units.

Estimated Regression Coefficients for Yield

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0.147877	0.011319	13.065	0.000
pH	-0.022735	0.006768	-3.359	0.008
C Inokulum	0.017422	0.006768	2.574	0.030
C Gula	0.004225	0.006768	0.624	0.548
pH*pH	-0.020337	0.006572	-3.094	0.013
C Inokulum*C Inokulum	0.001582	0.006572	0.241	0.815
C Gula*C Gula	0.013660	0.006572	2.078	0.067
pH*C Inokulum	-0.001112	0.008948	-0.124	0.904
pH*C Gula	0.002062	0.008948	0.230	0.823
C Inokulum*C Gula	-0.020913	0.008948	-2.337	0.044

S = 0.0253091 PRESS = 0.0241352
R-Sq = 81.85% R-Sq(pred) = 24.03% R-Sq(adj) = 63.71%

Analysis of Variance for Yield

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	0.026004	0.026004	0.002889	4.51	0.018
Linear	3	0.011724	0.011724	0.003908	6.10	0.015
pH	1	0.007229	0.007229	0.007229	11.29	0.008
C Inokulum	1	0.004245	0.004245	0.004245	6.63	0.030
C Gula	1	0.000250	0.000250	0.000250	0.39	0.548
Square	3	0.010738	0.010738	0.003579	5.59	0.019
pH*pH	1	0.007961	0.006133	0.006133	9.58	0.013
C Inokulum*C Inokulum	1	0.000009	0.000037	0.000037	0.06	0.815
C Gula*C Gula	1	0.002767	0.002767	0.002767	4.32	0.067
Interaction	3	0.003543	0.003543	0.001181	1.84	0.210
pH*C Inokulum	1	0.000010	0.000010	0.000010	0.02	0.904
pH*C Gula	1	0.000034	0.000034	0.000034	0.05	0.823
C Inokulum*C Gula	1	0.003499	0.003499	0.003499	5.46	0.044
Residual Error	9	0.005765	0.005765	0.000641		
Lack-of-Fit	5	0.002476	0.002476	0.000495	0.60	0.707
Pure Error	4	0.003289	0.003289	0.000822		
Total	18	0.031769				

Unusual Observations for Yield

Obs	StdOrder	Yield	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
18	18	0.195	0.148	0.011	0.047	2.06 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Estimated Regression Coefficients for Yield using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	0.193099
pH	0.182578
C Inokulum	1.49729E-07
C Gula	-0.0215444
pH*pH	-0.0203368
C Inokulum*C Inokulum	5.39351E-16
C Gula*C Gula	0.000136603
pH*C Inokulum	-6.49635E-10
pH*C Gula	0.000206250
C Inokulum*C Gula	-1.22117E-09

E.2 Program MINITAB® untuk Variabel Mikroorganisme *Mixed Culture Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*

Response Surface Regression: Yield versus pH, C Inokulum, C Gula

The analysis was done using coded units.

Estimated Regression Coefficients for Yield

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0.196354	0.02014	9.751	0.000
pH	-0.030267	0.01204	-2.514	0.033
C Inokulum	0.061496	0.01204	5.108	0.001
C Gula	0.003867	0.01204	0.321	0.755
pH*pH	-0.022485	0.01169	-1.923	0.087
C Inokulum*C Inokulum	0.007937	0.01169	0.679	0.514
C Gula*C Gula	0.071705	0.01169	6.133	0.000
pH*C Inokulum	-0.004637	0.01592	-0.291	0.777
pH*C Gula	0.000188	0.01592	0.012	0.991
C Inokulum*C Gula	-0.009612	0.01592	-0.604	0.561

S = 0.0450255 PRESS = 0.122864

R-Sq = 89.86% R-Sq(pred) = 31.69% R-Sq(adj) = 79.71%

Analysis of Variance for Yield

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	0.161623	0.161623	0.017958	8.86	0.002
Linear	3	0.065912	0.065912	0.021971	10.84	0.002
pH	1	0.012812	0.012812	0.012812	6.32	0.033
C Inokulum	1	0.052891	0.052891	0.052891	26.09	0.001
C Gula	1	0.000209	0.000209	0.000209	0.10	0.755
Square	3	0.094799	0.094799	0.031600	15.59	0.001
pH*pH	1	0.018255	0.007497	0.007497	3.70	0.087
C Inokulum*C Inokulum	1	0.000298	0.000934	0.000934	0.46	0.514
C Gula*C Gula	1	0.076247	0.076247	0.076247	37.61	0.000
Interaction	3	0.000912	0.000912	0.000304	0.15	0.927
pH*C Inokulum	1	0.000172	0.000172	0.000172	0.08	0.777
pH*C Gula	1	0.000000	0.000000	0.000000	0.00	0.991
C Inokulum*C Gula	1	0.000739	0.000739	0.000739	0.36	0.561
Residual Error	9	0.018246	0.018246	0.002027		
Lack-of-Fit	5	0.015082	0.015082	0.003016	3.81	0.109
Pure Error	4	0.003164	0.003164	0.000791		
Total	18	0.179868				

Unusual Observations for Yield

Obs	StdOrder	Yield	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
1	1	0.264	0.204	0.037	0.059	2.26 R
11	11	0.049	0.114	0.035	-0.064	-2.32 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Estimated Regression Coefficients for Yield using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	9.28960
pH	0.314432
C Inokulum	-4.43586E-07
C Gula	-0.151160
pH*pH	-0.0224850
C Inokulum*C Inokulum	8.12747E-14
C Gula*C Gula	0.000717046
pH*C Inokulum	-1.48400E-08
pH*C Gula	1.87500E-05
C Inokulum*C Gula	-3.07600E-09

RIWAYAT PENULIS



Belli Martha Judika Silaban, penulis lahir di Merauke pada tanggal 14 Oktober 1995 yang merupakan anak pertama dari lima bersaudara. Penulis telah menempuh pendidikan formal, yaitu lulus dari TK Kristen Kalam Kudus pada tahun 2001, lulus dari SD Kristen Kalam Kudus pada tahun 2007, lulus dari SMP RK Budi Mulia pada tahun 2010, dan lulus dari SMA RK Budi Mulia pada tahun 2013. Setelah menyelesaikan pendidikan di jenjang SMA, penulis melanjutkan pendidikan Strata-1 di Departemen Teknik Kimia, FTI – ITS dengan nomor registrasi 2313100046. Selama kuliah penulis aktif di Persekutuan Doa Kristen Katolik (PDKK) Teknik Kimia ITS, Persekutuan Mahasiswa Kristen ITS, Himpunan Mahasiswa Teknik Kimia, serta berbagai pelatihan dan seminar yang diadakan di Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS).

Email : bellisilaban@gmail.com

Hp : 085277546135

RIWAYAT PENULIS



Li, Felix Yuwono lahir di Semarang pada tanggal 5 Februari 1996 yang merupakan anak pertama dari dua bersaudara. Penulis telah menempuh pendidikan formal yaitu, lulus dari TK Bhinneka pada tahun 2002, lulus dari SD Marsudirini pada tahun 2008, lulus dari SMP PL Domenico Savio pada tahun 2010, dan lulus dari SMA Kolese Loyola pada tahun 2013.

Setelah menyelesaikan pendidikan di jenjang SMA, penulis melanjutkan ke pendidikan Strata-1 di Departemen Teknik Kimia, FTI – ITS dengan nomor registrasi 2313100075. Selama kuliah penulis aktif di Keluarga Mahasiswa Katholik (KMK) ITS, organisasi Keluarga Eks Kolese Loyola Surabaya, CHERNIVAL (Chemical Engineering Innovation Festival), serta berbagai kegiatan kepanitiaan dan pelatihan yang diadakan di Insitut Teknologi Sepuluh Nopember.

Email : felixyuwono18@gmail.com

Hp : 085879061610